

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 1 月 25 日 (25.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/05987 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/85, A01K 67/027 (74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) ; 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/02916
- (22) 国際出願日: 2000 年 5 月 2 日 (02.05.2000) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/200997 1999 年 7 月 14 日 (14.07.1999) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社トランスジェニック (TRANSGENIC INC.) [JP/JP]; 〒862-0976 熊本県熊本市九品寺1丁目18番7号 Kumamoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山村研一 (YAMAMURA, Ken-ichi) [JP/JP]. 荒木喜美 (ARAKI, Kimi) [JP/JP]; 〒862-0976 熊本県熊本市九品寺4-24-1 熊本大学発生病学研究センター内 Kumamoto (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TRAP VECTOR AND GENE TRAPPING METHOD BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: トラップベクター及びこれを用いた遺伝子トラップ法

(57) Abstract: A trap vector containing a mutated loxP in which, in the loxP sequence consisting of a reverse repetitive sequence 1, and spacer sequence and a reverse repetitive sequence 2 in this order, a mutation is transferred into a part of the reverse repetitive sequence 1 or a part of the reverse repetitive sequence 2.

(57) 要約:

逆反復配列 1、スペーサー配列及び逆反復配列 2 の順で構成される loxP 配列のうち逆反復配列 1 の一部の配列又は逆反復配列 2 の一部の配列に変異が導入された変異型 loxP を含むトラップベクター。

WO 01/05987 A1

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 1 月 25 日 (25.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/05987 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/85, A01K 67/027 (74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5 森ビル3階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/02916
- (22) 国際出願日: 2000 年 5 月 2 日 (02.05.2000) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/200997 1999 年 7 月 14 日 (14.07.1999) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社トランスジェニック (TRANSGENIC INC.) [JP/JP]; 〒862-0976 熊本県熊本市九品寺1丁目18番7号 Kumamoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山村研一 (YAMAMURA, Ken-ichi) [JP/JP], 荒木喜美 (ARAKI, Kimi) [JP/JP]; 〒862-0976 熊本県熊本市九品寺4-24-1 熊本大学発生病学研究センター内 Kumamoto (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TRAP VECTOR AND GENE TRAPPING METHOD BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: トラップベクター及びこれを用いた遺伝子トラップ法

(57) Abstract: A trap vector containing a mutated loxP in which, in the loxP sequence consisting of a reverse repetitive sequence 1, and spacer sequence and a reverse repetitive sequence 2 in this order, a mutation is transferred into a part of the reverse repetitive sequence 1 or a part of the reverse repetitive sequence 2.

(57) 要約:

逆反復配列 1、スパーサー配列及び逆反復配列 2 の順で構成される loxP 配列のうち逆反復配列 1 の一部の配列又は逆反復配列 2 の一部の配列に変異が導入された変異型 loxP を含むトラップベクター。

WO 01/05987 A1

明 細 書

トラップベクター及びこれを用いた遺伝子トラップ法

技術分野

本発明は、遺伝子トラップ法によるランダム変異 ES クローン技術に関する。

背景技術

ヒトゲノムプロジェクトの進展で、ヒトゲノムの構造解析は 2003 年又はそれ以前に終了すると言われている。したがって、個々に遺伝子を単離し、構造解析を行なう時代ではなく、ゲノムの「機能解析」の時代に入ったといえる。

しかし、ゲノムの塩基配列のみでは、機能に関する情報は十分でないため、機能解析のための新しい解析系が必要である。さらに、ヒトゲノム解析の一つの大きな目標はヒト疾患の原因遺伝子の解明であるが、原因遺伝子の構造だけでは病気を説明することはできない。また、ヒト患者を用いて実験することはできず、発症機構を解析することはできない。

したがって、原因遺伝子の同定後の発症過程の解析と新たな治療法の開発のためには、モデル個体の作製が必須課題となっている。

一方、ゲノムを、その構造から遺伝子部分とそれ以外の部分に分けるとすれば、それぞれ別個の機能を有すると考えられ、両者の機能を解析することが必要である(図 1)。ゲノム全体から見れば、個々の遺伝子は一部の機能しか果たしておらず、ゲノムは単に遺伝子の集合体ではなく、まだ知られていない機能を有しているとも考えられる。事実、position effect mutation という新しい概念が成立したことから、ゲノムには機能が未知の領域を有するものと推察される。

遺伝子部分については、調節領域とコード領域があるが、現在ゲノム機能解析の標的となっているのは、コード領域である。ヒトとマウスを比べてみても、遺伝子の種類はほぼ同じであるため、調節領域の機能解析は重要である。但し、ヒトの遺伝子とマウスの遺伝子との間には、種の相違がある。この違いは、タンパク質の違いではなく、遺伝子発現の調節の違いによるものと思われる。

発現調節にあずかる転写因子等の機能は、遺伝子のコード領域の配列から解明することができる。その転写因子が結合するエレメントの解析は、一つの遺伝子の調節領域内に多数存在するので、機能の解明は現在のところ極めて困難である。但し、機能解析の一手法として、細菌人工染色体を用いる方法等が考え得る。

コード領域の機能解析のレベル（対象）は、mRNA レベル、蛋白レベル、細胞レベル、組織・臓器レベル、個体レベルが考えられる。mRNA レベルは、DNA チップで対応できると考えられる。他方、mRNA 以外のレベルの解析を考えると、ES 細胞を利用するのが最も良い方法と思われる。なぜなら、ES 細胞から直接 *in vitro* で、各種細胞や組織の誘導系が開発されているものもあるし、今後開発され得る可能性のあるものも多いからである。また、個体レベルの解析系が樹立できる利点もあるためである。

上記から、ゲノムの機能解析を考える上でも、ES 細胞レベルでの遺伝子破壊とそのマウスの作製は極めて重要であることがわかる。

これまでは、ES 細胞を用いた相同遺伝子組換え法が、遺伝子破壊マウス作製において主役を演じていたが、これを個々の遺伝子破壊マウスを作製するという戦術としてではなく、網羅的に作製するという戦略的な立場から見たとき、大きな問題点がある。

第 1 は、時間がかかりすぎることである。遺伝子破壊マウス作製において、ES 細胞を用いた相同組換えによるノックアウト ES クローンを単離することが律速段階となっている。1 人の熟練した研究者でも、ノックアウト ES クローンを単離するには最低 3 ヶ月かかるので、年間 4 遺伝子を破壊できるにすぎない。従って、10 万個の遺伝子にそれぞれ一つの変異を導入する場合は、1 年あたり 25,000 人が必要とされる。現在世界中で、1 年間に約 1000 系統の遺伝子破壊マウスが作製されていると見積もられている。そうすると、ノックアウト ES クローンを 10 万種類作製するのに 100 年かかることになる。これでは、2003 年に終了するといわれているヒトゲノムの構造解析の進展と比較しても、現実的ではない。

第 2 は、コストがかかりすぎることである。1 系統の遺伝子破壊マウス作製のため、人件費及び減価償却費を除いても、最低 200～400 万円必要である。したがって、10 万個の単純な遺伝子破壊マウス作製だけで 2,000～4,000 億円必要とな

る。

以上のように、従来の ES 細胞を用いた相同遺伝子組換えには問題点があり、また、ゲノムは巨大ではあるが、数は決まっている。従って、この中から重要な機能を持つ遺伝子を単離することが必要となる。遺伝子の機能については、遺伝子破壊マウスを作製して初めて明らかになることが多いことから、遺伝子破壊マウスは将来画期的な薬剤の開発等にも直結し、極めて付加価値が高い。従って、「ランダム」かつ「大規模」にマウスの変異体作製を行なうのが世界の「戦略」となっており、現在のところ、以下に述べる 3 つの方法が、ランダム変異マウス作製において、もっとも妥当であると考えられている。

第 1 は、変異原物質であるエチルニトロソウレア (ethylnitrosourea:ENU) を用いる方法である。ENU を用いた方法による大規模な突然変異体作製のプロジェクトがヨーロッパで開始されている。ドイツではヒトゲノムプロジェクトの一貫として哺乳類遺伝学研究所のパリング博士を中心として 1997 年度に開始した。英国においてもスミスクライン社が資金を提供し、Harwell にある MRC のマウスゲノムセンターにおいてブラウン博士を中心として主に脳・神経系の突然変異マウスを樹立することを目的として開始している。現在までに、両者併せて、優性遺伝を示す変異マウスが約 200 系統樹立され、予想よりもよい効率でプロジェクトが進行している。米国においてもケースウエスタンリザーブ大学やオークリッジ国立研究所を中心として、膨大な予算 (年間 60 億円) でマウスゲノムの構造解析や ENU 法による変異体作製が始まることとなった。

ENU を成熟雄マウスに投与すると、減数分裂前の精原細胞に作用し、1 細胞当たり約 50-100 カ所に点突然変異をランダムに引き起こす。そして、1 つの遺伝子座につきおよそ 1/1,000/配偶子の頻度で突然変異が起こる。したがって、1 匹の処理マウスを雌マウスと交配することにより、F1 世代で多種類の変異マウスを作製できる。また、ENU を用いる方法は、特定の遺伝子座について 1,000 匹をスクリーニングすれば、1 匹はその遺伝子に変異が生じている確率となるため、極めて効率がよいと考えられている。

第 2 は、やはり変異原物質であるクロラムブシルを用いる方法である。この方法によれば、ENU 法と同じ頻度で精原細胞に突然変異を引き起こす。ただし、こ

の場合は時に 1 メガベースに及ぶ欠失変異が生じる。

第 3 は遺伝子トラップ法によるものである。遺伝子トラップ法とは、マーカー遺伝子を含むトラップベクターを ES 細胞に導入し、マーカー遺伝子の発現を指標として未知遺伝子の探索を行なうことを目的として開発された方法である。トラップベクターの組み込みはランダムであり、その組み込みにより、殆どの場合内在性遺伝子（本来、その細胞や組織に存在する遺伝子）は破壊される。したがって、その ES 細胞を用いてキメラマウスを作製することにより、種々の遺伝子破壊マウスを作製できる。

しかしながら、これら変異原物質を用いる方法及び遺伝子トラップ法は、それぞれ利点と欠点を有する（表 1）。

表 1

	ENU 法	クロラムブシル法	遺伝子トラップ法
変異の性質	点変異	欠失変異	自在の変異
変異マウス作製	容易	容易	困難
変異遺伝子同定	困難	中程度	容易
その他の特徴			ES トラップクローンの利用が可能

ENU 法は、変異マウスの作製は容易であるが、個々の変異系統の樹立は、交配により分離を行わなければならない。また、変異した遺伝子の同定には、まず多型 DNA マーカーを用いた連鎖解析により遺伝子座を同定し、その後にポジショナルクローニング法により遺伝子を単離しなければならない。従って、ENU 法は操作が煩雑である。

クロラムブシル法は、変異マウスの作製は容易であるが、欠失部位を同定しなければならず、そのためには多数の多型 DNA マーカーを用いて解析する必要がある。また、一般的に、クロラムブシル法などの変異原物質法では、大規模の飼育室を必要とするため、費用及び労力がかかる。

遺伝子トラップ法は、変異マウスの作製に手間と技術を要するが、変異遺伝子の同定は容易であり、飼育室の規模に応じて実験可能である。遺伝子トラップ ES クローンはそれ自体ゲノム機能解析のための貴重なリソースとなり、この点も他の方法と際立って異なる点である。

遺伝子トラップ法についても、世界のいくつかの研究室で変異体作製が始まっている。米国では、民間のレキシコンジェネティクス社がレトロウイルスベクターを用いた遺伝子トラップによるランダム破壊を行なっている。しかし、遺伝子をトラップできていても、内在性遺伝子を破壊できているかどうか定かでないこと、生殖キメラマウスが作製できるかどうか不明であること、キメラマウス作製は別料金を要求されること、利用するに当たって相当な金額を要求していることなどから、一般の研究者にとっては殆ど利用できない状況である。また、ドイツではENUプロジェクトの一貫としても12,000クローンを目標として遺伝子トラップが行なわれている。いずれにしても、マウス系統の樹立よりも、トラップした遺伝子の解析を先行させる方法で進められている。

発明の開示

本発明が解決しようとする課題は、従来の遺伝子トラップ法の問題点を克服し、ほぼ理想的と思われる新規の「可変型遺伝子トラップ法」を開発し、この方法を用いて大規模なESトラップクローンの樹立とそれを用いたマウス変異体作製を行なうことにある。従って、本発明は、本発明は、トラップベクター、遺伝子トラップ法、トラップされた遺伝子が導入されたトランスジェニック又はノックアウト動物、さらにトラップされた遺伝子を提供することを目的とする。

本発明者は上記課題を解決するために鋭意研究の結果、遺伝子トラップ法にバクテリオファージ由来の組換えシステムである、Cre-loxPを利用することを思いつき、本発明を完成するに至ったものである。ここでCreは組換え酵素であり、loxP配列を認識して、この部位で組換えを起こすものである。

すなわち、本願は、以下の発明を提供する。

(1) 逆反復配列1、スペーサー配列及び逆反復配列2の順で構成されるloxP配列のうち、逆反復配列1の一部の配列又は逆反復配列2の一部の配列に変異が導入された変異型loxPを含むトラップベクター。

ここで、逆反復配列1の一部の配列に変異が導入されたものとしてはlox71(例えば配列番号1に示されるもの)が挙げられ、逆反復配列2の一部の配列に変異が導入されたものとしてはlox66(例えば配列番号2に示されるもの)が挙げら

れる。

(2) 逆反復配列 1 の一部の配列に変異が導入されたトラップベクターと逆反復配列 2 の一部の配列に変異が導入されたトラップベクターとが組換えを起こしたベクター。

(3) 以下の (a) ~ (i) のトラップベクター。

(a) SP-SA-lox71-IRES-M-loxP-PV-SP

(b) SP-lox71-IRES-M-loxP-PV-SP

(c) SA-lox71-IRES-M-loxP-pA-PV-SP

(d) SA-lox71-IRES-M-loxP-puro-pA-PV-SP

(e) lox71-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511

(f) lox71-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511

(g) (lox71 が組み込まれた SA) -M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511

(h) (lox71 が組み込まれた SA) -IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511

(i) (lox71 が組み込まれた SA) -M-loxP-pA-lox2272-プロモーター-M-lox511-SD
(SP は任意配列を、SA はスプライスアクセプターを、SD はスプライスドナーを、IRES は分子内リボゾームエントリー部位を、M はマーカー遺伝子を、puro はピューロマイシン耐性遺伝子を、pA はポリ A 配列を、PV はプラスミドベクターを表す。)

上記 (a) ~ (i) のトラップベクターにおいて、マーカー遺伝子としては β -geo 遺伝子が挙げられ、プラスミドベクターとしては、pBR322、pUC (pUC18、pUC19、pUC118、pUC119 等)、pSP (pSP64、pSP65、pSP73 等)、pGEM (pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z 等) が挙げられる。

(4) 前記いずれかのトラップベクターを胚幹細胞に導入することを特徴とする遺伝子トラップ方法、及び該方法によりトラップベクターが導入された胚幹細胞。

(5) 前記胚幹細胞を動物に導入することを特徴とするトランスジェニック動物又はノックアウト動物の作製方法、及び該方法により作製されたトランスジェニック動物又はノックアウト動物。

上記動物としては、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、ヒツジ及びヤギからなる群から選択されるいずれか 1 種が挙げられる。

以下、本発明を詳細に説明する。本明細書は、本願の優先権の基礎である日本

国平成11年特許出願第200997号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

本発明は、遺伝子トラップ法、トラップされた遺伝子が導入されたトランスジェニック又はノックアウト動物、さらにトラップされた遺伝子に関するものである。本発明のトラップ法の概要を図2に示す。まず、本発明の目的を達成するためトラップベクターを構築し、これをES細胞に導入してトラップクローンを単離及び選択する(図2A~C)。図2ではpU-Hachiトラップベクターを例示する。その後、キメラ動物(例えばキメラマウス)を作製してトラップクローン由来のマウスを作製する(図2F~G)。一方、単離及び選択されたトラップクローンを用いて、トラップされた遺伝子の単離及び配列決定、並びにプラスミドレスキューによるゲノムの回収を行う(図2C~E)。さらに、クローンを電気穿孔法及びピューロマイシン等の薬剤選択を行い、トラップされた遺伝子を発現させ、ESクローンのマウス系列の作製を行う(図2H~I)。

本発明をまとめると以下の通り要約できる(パイロットスタディを含む)。

(I) 全体の効率

(I-1) 胚様体形成によるスクリーニング

ネオ耐性クローン106個を浮遊培養し、胚様体を形成させ、ES細胞の段階及び分化誘導後の2点でb-galの発現を解析した。その結果、90個(86%)のトラップクローンは、いずれかの時期で発現していた。

(I-2) 単一コピーの組込みを示すクローンの選別

胚様体形成過程での遺伝子発現を示した109個のトラップクローンについて、DNAを抽出し挿入パターンを解析した。その結果、75個(70%)は単一コピーの挿入であり、そのうち完全なもの(プラスミド起源を保持するもの)が24個(22%)、pUC部分が欠失したものが40個(37%)であった。pUCが欠失しても、lox71部位を利用すればpUCは再び挿入できるので、これら64個(59%)のクローンについて利用できることが分かった(表4)。

(I-3) 生殖キメラ作製効率

上記のトラップクローンを用いてキメラマウスを作製したが、約半数のクローンにおいて生殖キメラマウスが得られた。

(1-4) 全体の要約

最初に選択したネオ耐性クローンの約 26%のものが最終段階にまで至ることが分かった。生殖キメラ作製効率は現在上昇しているので、もう少し全体の効率をあげることができると考えられるが、現時点でも十分研究の実施には差し支えないほどのよい効率であると考えられる。

(2) 遺伝子トラップ法の効率

これまでの試験の結果、24 トラップ系統を樹立した。遺伝子レベルの解析まで進んだものは 13 系統であり、塩基配列を Blast program を用いて Genbank および EMBL データベースと比較した。その結果、9 クローンが既知遺伝子、3 クローンは EST、残り 1 クローンは未知遺伝子であった (表 2)。これまで他の研究者による報告では、10-25%が既知遺伝子、10-20%が EST、50-80%が未知遺伝子、2-10%がリピートである。

表 2

	既知遺伝子	EST	未知遺伝子	リピート
本発明	9 (69. 2%)	3 (23. 1%)	1 (7. 7%)	
既報	10-25%	10-20%	50-80%	2-10%

(3) トラップされた遺伝子

胚様体形成によるスクリーニング法にまり、発生や細胞増殖に関連する遺伝子を効率よくトラップしているかどうかを、既知遺伝子の種類を調べることで検討した。その結果、転写因子である CBP (CREB binding protein) や Spl、細胞周期に関与する cyclin B2、シグナル伝達に関与する Crk と pHPS1-2、翻訳に関与する rRNA、snRNP L、RNA polymerase I、そしてミトコンドリア DNA であった (表 3)。それぞれよく知られた遺伝子がトラップされていることが分かった。これらの多くは、細胞増殖に関与する遺伝子であり、胚様体形成によるスクリーニング系が、よく機能していることを示唆している。

表 3

クラス	クローン番号	遺伝子
1. 核		
(1) 転写	Ayu3-112	CBP
	Ayu8-038	Sp1
(2) 細胞周期	Ayu3-008	Cyclin B2
	Ayu6-003	大腸菌の細胞分裂タンパクである Ftsj1に相同
(3) シグナル伝達	Ayu8-104	Crk
	Ayu8-025	pHPS ₁ -2
(4) 細胞骨格	Ayu8-003	dynammin II
2. 細胞質		
(1) 翻訳	Ayu3-022	rRNA
	Ayu8-016	sul1
	Ayu8-016	hnRNP Lの上流
	Ayu8-019	RNA polymerase Iの可能性大
(2) その他	Ayu3-001	ミトコンドリアDNA
3. 未知	Ayu7-003	不明

(4) トラップによる遺伝子破壊の確認

遺伝子トラップにより、実際に内在性遺伝子が破壊されるかどうか重要なポイントの一つであるので、6つの既知遺伝子について、トラップ部位の構造を解析した。その結果、1つはプロモーター領域、1つはエクソン内に、4つはイントロン内に挿入されており、すべてにおいて遺伝子が完全または部分的に破壊されていた。したがって、本発明の遺伝子トラップ法により、効率よく内在性遺伝子を破壊できることが明らかとなった(図10)。

以下、本発明をさらに詳しく説明する。

1. トラップベクターの構築

遺伝子トラップ法とは、トラップベクターをES細胞に導入すると、偶然及びランダムにマウス内在性遺伝子に組込まれることを利用して、未知遺伝子をゲノム上でトラップするというものである。「遺伝子トラップ」とは、トラップベクターがゲノム上の特定の遺伝子に入り込んで、当該特定の遺伝子を捕まえることを意味し、遺伝子を捕らえるためのベクターを「トラップベクター」という。遺伝子にはエンハンサー、プロモーター、エクソン、ポリAなどが存在し、それぞれを

捕獲することができるが、そのためには、目的に応じた構造を持つトラップベクターを使用することができる。

一般に、エクソントラップベクターは、スプライスアクセプターのみを有するレポーター遺伝子、薬剤選択マーカー遺伝子、及びプラスミド部分から構成されており、マウス内在性遺伝子の下流に組み込まれたときにのみ、レポーター遺伝子が発現する。換言すれば、トラップベクター中のレポーター遺伝子の発現をモニターすることで、内在性遺伝子への組込みを知ることができる。また、pUC19などのプラスミドをトラップベクターに連結しておく、いわゆるプラスミドレスキュー法と呼ばれる手法により、トラップした内在性遺伝子を単離することができる。「プラスミドレスキュー法」とは、エレクトロポレーション法等により形質転換された細胞をアンピシリン選別等にかけて目的の遺伝子を回収する方法である（図 2E）。しかも、トラップ時にその遺伝子を破壊するので直ちに遺伝子破壊マウスを作製することができる。さらに、レポーター遺伝子はマウス内在性遺伝子の発現調節領域に支配されて発現するので、内在性遺伝子の発現の組織特異性、時期特異性を簡単に解析することができる。

従来の遺伝子トラップ法では、遺伝子を完全に破壊できても、ヒト遺伝病で見られるような小さな変異、例えば 1 アミノ酸置換といった変異を導入することができず、またヒト遺伝子と置換することもできないという問題点があった。そこで、本発明は、これらの問題点を解消するため、バクテリオファージ由来の組換えシステムである、Cre-loxP を改変し、それを遺伝子トラップ法に利用することにより、一旦遺伝子トラップベクターを組み込ませてマウス遺伝子を破壊した後、トラップベクター内の変異 lox 部位に、任意の遺伝子を挿入できることとしたものである。これによって、ヒト遺伝病で見られるような小さな変異、例えば 1 アミノ酸置換といった変異を導入することが可能となり、またヒト遺伝子と置換することも可能となる。本発明のトラップベクターは、種々の遺伝子をトラップするために使用することができるが、エクソントラップ又はプロモータートラップ用として好ましく使用することができる。

loxP (locus of crossing (X-ring) over, P1) は 34 塩基 (5'-ataacttcgtatagcatacat tatacgaagttat-3') からなる配列であり (配列番号 3)、5' 末端から 13

塩基 (逆反復配列 1 という)、及び 3' 末端から 13 塩基の配列 (逆反復配列 2 という) が、それぞれ逆反復配列を構成し、「gcatacat」により示される 8 塩基のスペーサーと呼ばれる配列が上記逆反復配列 1 及び 2 に挟まれている (図 3)。「逆反復配列」とは、スペーサーを境界として一方の側の配列が、他方の側の配列と、互いに向き合う方向に相補的であるような配列を意味する。換言すれば、一方の側の配列のうちセンス鎖の配列が、他方の側の配列のアンチセンス鎖と、互いに向き合う方向に相同であることを意味する。方向が互いに向き合っており、二本鎖を形成したときの配列自体は同一で繰り返されているため、逆反復配列と呼ばれる。図 3 に示す通り、二本鎖のうち一方の鎖 (例えばセンス鎖) において、紙面左側の逆反復配列 1 (5'-ataacttcgtata-3' : 配列番号 4) は、紙面右側の逆反復配列 2 (5'-tatacgaagttat-3' : 配列番号 5) に対し、それぞれ、5' → 3' 方向、3' ← 5' 方向に相補的という関係になっている。

loxP は、通常の配列と異なり方向性を有する。従って、本発明において、上記 5' → 3' の向きで loxP の配列を表示するときは、その表示中に紙面左向きの矢印 (例えば「⇐」) を含めることとする。

Cre (causes recombination) とは、遺伝子組換えを起こさせる組換え酵素 (リコンビナーゼともいう) を意味し、上記反復配列を認識し、スペーサー部の「cataca」を粘着末端とする切断様式で切断する (図 3)。

ところで、バクテリアの中では、2 カ所の loxP 間で組換えが起こり、挿入または削除反応が起こる。哺乳類細胞で挿入反応を起こすことができれば、後に任意の遺伝子を挿入できるので、応用性は格段に広がる。哺乳類細胞では核が大きいので、一旦削除された loxP を持つ環状 DNA は拡散してしまい、挿入反応は殆ど観察されない。

そこで、本発明者は、挿入反応を起こすために loxP 配列に変異を導入し、一旦遺伝子がゲノムに挿入されると挿入された遺伝子は削除できない (ゲノムから脱離しない) ようにすることを考え、このため 2 種類の変異型 loxP を準備した (図 4)。

1 つは、loxP の反復配列 (センス鎖側) のうち紙面左側の反復配列 (ATAACTTCGTATA) の左から 5 塩基までを、「TACCGTTCGTATA」となるように置換変

異(下線部が変異させた部分。)を導入したものであり、これを「lox71」と名付けた(配列番号1;図4b)。もう1つは、紙面右側の反復配列(TATACGAAGTTAT)を、右から5塩基まで「TATACGAACGGTA」(下線部が変異させた部分。)となるように置換変異を導入したもので、これを「lox66」と名付けた(配列番号2;図4b)。

ゲノム上のlox71とプラスミド上のlox66との間で組換えが起こると、挿入されたDNAの5'側(紙面左側)にはloxPの両側の反復配列が変異したもの(「lox71/66」という:TACCGTTCGTATA GCATACAT TATACGAACGGTA:配列番号6)が、右側には野生型のloxP(ATAACTTCGTATA GCATACAT TATACGAAGTTAT:配列番号3)が配置される(図4a)。その結果、Creはもはやlox71/66を見分けることができず、loxPとの間で組換えを起こせず、ゲノムに遺伝子は挿入されたままとなる。すなわち、loxP同士の相同組換えの場合は、切り出されたloxPを含む環状DNAが物理的に離れるので、挿入よりも削除に反応は傾く。一方、染色体側にlox71を、及び環状DNA側にlox66を用いると、組み込まれたときに生ずるlox71/66をCreリコンビナーゼは認識できにくくなり、削除反応より挿入反応に傾くため、挿入状態が維持される(図5)。ここで、本発明においては、染色体側にlox66を、環状DNA側にlox71を用いることもできる。

実際に、ES細胞にあらかじめlox71などの変異型loxP(以下「変異型lox」ともいう)を組み込んでおき、そこに他の変異型loxP(例えばlox66)を含むプラスミドを導入すると、プラスミドがゲノムに組込まれる。したがって、例えばこのlox71をあらかじめ遺伝子トラップベクターに組み込んでおけば、あとでいかなる遺伝子でもlox66を用いて挿入することが可能となる。つまり、小さな変異を導入した遺伝子やヒトの遺伝子で置換することも可能となった。

この変異型lox(lox71又はlox66)を利用した遺伝子トラップベクターは、以下の通り構築することができる(図6参照)。但し、以下のトラップベクターは例示であって、限定されるものではない。従って、以下のベクターにおいて、変異型loxとしてlox71を例示するが、これに限定されるものではなく、lox71の代わりにlox66を用いたものも、本発明のトラップベクターに含まれる。

(a) U8: SP-SA-lox71-IRES-M-pA-loxP-PV-SP

(b) U8delta: SP-lox71-IRES-M-pA-loxP-PV-SP

- (c) pU-Hachi: SA-lox71-IRES-M-loxP-pA-PV-SP
- (d) pU-12: SA-lox71-IRES-M-loxP-puro-pA-PV-SP
- (e) pU-15: lox71-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
- (f) pU-16: lox71-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
- (g) pU-17: (lox71 が組み込まれた SA)-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
- (h) pU-18: (lox71 が組み込まれた SA)-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
- (i) (lox71 が組み込まれた SA)-M-loxP-pA-lox2272-プロモーター-M-lox511-SD

上記ベクターの構成要素において、SP は任意配列を、SA はスプライスアクセプターを、SD はスプライスドナーを、IRES は分子内リボソームエントリー部位を、M はマーカー遺伝子を、puro はピューロマイシン (puromycin) 耐性遺伝子を、pA はポリ A 配列を、PV はプラスミドベクターを表す。

トラップベクターがゲノム DNA に組み込まれる際に、ほとんどのケースでベクターの一部が欠失し、その結果、ベクターの重要な部分が欠失する場合がある。SP は、そのような欠失を防ぐためのダミーとして付加した任意配列であり、配列は自由に決定することができる。SP の配列の長さは 100~1000 塩基、好ましくは 300~400 塩基である。また、公知の任意配列を SP に使用することができる。公知配列としては、例えばウサギ β -グロビン遺伝子の一部等が挙げられる。

スプライスアクセプターは、スプライシングの際にエキソンの 3' 末端側に連結することができる配列を意味する。

スプライスドナーは、スプライシングの際にエキソンの 5' 末端側に連結することができる配列を意味する。

IRES は、分子内リボソームエントリー部位 (internal ribosomal entry site) と呼ばれ、タンパク質合成の際にアミノアシル t-RNA が結合するリボソーム上の部位 (A 部位) であり、CAP 非依存的に翻訳を開始できるようにするための配列である。

マーカー遺伝子は、本発明のベクターが標的遺伝子をトラップできたか否かを示すマーカーとなる遺伝子であり、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ 遺伝子)、又は lacZ 遺伝子とネオマイシン (G418) 耐性遺伝子との融合遺伝子 (β -geo 遺伝子)、CAT 遺伝子、GFP 遺伝子、SV40 ラージ T 遺伝子、ネオマイ

シン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン S 耐性遺伝子等が挙げられる。

プラスミドベクターは、遺伝子トラップ後に内在性遺伝子をプラスミドレスキュー法により単離するために使用されるものである。「プラスミドレスキュー法」とは、トラップベクター内のプラスミド（大腸菌で増やせるもの）の一部を利用して当該プラスミド部分の近接領域を回収する方法を意味する。例えば、プラスミドにゲノム DNA が連結された場合において、制限酵素処理によりプラスミドとゲノム DNA とが連結した断片を切り出し、切り出した断片を環状にした後、大腸菌に導入して増殖させると、プラスミドに近接したゲノム DNA を回収することができる。プラスミドベクターとしては、例えば pBR322、pUC (pUC18、pUC19、pUC118、pUC119 等)、pSP (pSP64、pSP65 等)、pGEM (pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z 等) 等が挙げられる。なお、プラスミドベクターには、supF、アンピシリン耐性遺伝子、複製開始点、及びクローニングのための制限酵素部位（例えばマルチクローニング部位）を単独で又は適宜組み合わせで連結しておくことができる。

上記 (a) に示すベクターを U8 という。U8 の基本部分 (SA-IRES- β -geo-pA : 図 7) は、pGT1.8IRESbetageo に由来している。この pGT1.8IRESbetageo は、マウス En-2 遺伝子由来のスプライスアクセプター、IRES、 β -geo を含んでいる。この pGT1.8IRESbetageo の BglII 部位に lox71 を組み込んだ後、SalI で処理し、SalI 断片を用意しておく。一方、pUC19 などのベクターに 180 塩基対の SP 配列、loxP、ポリ A シグナルを組み込み、プラスミド pEBN-Seti を作製する。このプラスミドの SalI 部位に、上記の SalI 断片を挿入し、U8 を作製する。したがって、この構造は、5' 側から順に任意配列、スプライスアクセプター、lox71、IRES、 β -geo、pA、loxP、pUC19、任意配列である (図 7)。

上記 (b) に示すベクターを U8delta という。U8delta は、U8 のスプライスアクセプターを削除したベクターである。このベクターは、lox71 がレポーターである β -geo の前に、loxP が β -geo の後ろに接続された構成となっている。このような構成としたのは、ベクターが組込まれたのちに、Cre を一過性に発現させることで、中間の IRES と β -geo 部分を完全に除去できるからである。その結果、プラスミド pUC19 が上流に存在するマウス内在性遺伝子の近傍に位置することにな

り、マウス内在性遺伝子を容易に単離することができる。

上記(c)に示すベクターを「pU-Hachi」という。このベクターは、SA-lox71-IRES-M-loxP-pA-PV-SPで構成されている。pU-HachiベクターはpGT1.8IRES β -geoに由来し、マウスEn-2遺伝子からのSA配列と、脳心筋炎ウイルス由来のIRES配列に連結した β -geo配列とを含有する。lox71のBamHI断片をpGT1.8IRES β -geoのBglII部位に挿入し、任意配列、loxP配列、及びマウスホスホグリセレートキナーゼ-1(PGK)由来のpoly A付加シグナルを、ベクターのLacZ配列が除去された改変型ベクターに挿入することによりプラスミドを構築する。SP配列は、トラップベクターの3'側を保護するために使用される。プラスミドの制限酵素SalI部位にSA-IRES-lox71- β -geoのSalI断片を挿入することにより、pU-Hachiを得ることができる。

上記(d)に示すベクターを「pU-12」という。このベクターは、SA-lox71-IRES-M-loxP-puro-pA-PV-SPで構成されている。pU12トラップベクターを構築するために、まずpE3NSE7のPGK poly(A)シグナルをピューロマイシン耐性遺伝子+PGK poly(A)シグナルに置き換え、さらにその下流のBglII部位にlox511を挿入する。得られるプラスミドの制限酵素部位にpU-HachiからのSA-IRES-lox71- β -geoのSalI断片を挿入することにより、pU-12を得ることができる。

上記(e)に示すベクターを「pU-15」という。このベクターは、lox71-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511で構成されている。ここで、「lox2272」は、loxPのスペーサー領域(gcatacat)のうち、第2番目のcをgに、第7番目のaをtに置換した配列(ggatactt)を有するものをいう。また、「lox511」は、loxPのスペーサー領域(gcatacat)のうち、第2番目のcをtに置換した配列(gtatacat)を有するものをいう。lox511及びlox2272は、loxP配列のスペーサー部分に変異があるため、それ自身(lox511同士、lox2272同士)とは組換えを起こすが、loxPやlox71とは組換えを起こさない変異lox配列である。なお、lox2272及びlox511の配列順序はどちらを前方又は後方にしてもよく、任意に選択することができる(以下同様)。

上記(f)に示すベクターを「pU-16」という。このベクターは、lox71-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511で構成されており、pU-15のlox71と β -geoとの間

に IRES を挿入することにより作製することができる。

上記 (g) に示すベクターを「pU-17」という。このベクターにおいて、lox71 は SA の一部の領域に挿入されている。例えば、pSP プラスミドに、lox511、loxP、PGK poly (A) シグナル、lox2272 を挿入してプラスミドを構築し、次に、pU-Hachi の SA 内に lox71 配列を挿入し、続いて β -geo をこの順に挿入する。このプラスミドを、先に構築しておいたプラスミドと連結することにより、pU-17 を得ることができる。

上記 (h) に示すベクターを「pU-18」という。このベクターも、pU-17 と同様、SA の中に lox71 が挿入されている。pU-18 は、pU-17 の SA と β -geo との間に IRES を挿入することにより得ることができる。

上記 (i) に示すベクターは、(lox71 が組み込まれた SA) -M-loxP-pA-lox2272-プロモーター-M-lox511-SD で構成される。このベクターは、pU-17 内の PV の代わりに プロモーター及び M をこの順で挿入し、lox511 の後方に SD を連結することにより得ることができる。このベクターには、プロモーターが付加されている。プロモーターとしては、特に限定されるものではなく、任意のものを使用することができる。例えば、後述の形質転換体作製の項に記載の細菌由来プロモーター、酵母由来プロモーターなどのほか、SP6 RNA ポリメラーゼプロモーター、T7RNA ポリメラーゼプロモーター、T3RNA ポリメラーゼプロモーターなどの RNA ポリメラーゼプロモーター、あるいは、EF1 (伸長因子 1) プロモーター、PGK (グリセリン酸キナーゼ) プロモーター、MC1 (ポリオーマエンハンサー/単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ) プロモーターなどの哺乳動物由来プロモーターを例示することができる。

2. 遺伝子トラップ

前記の通り作製されたベクターを用い、2 段階の遺伝子トラップを行う。

第 1 段階は通常の遺伝子トラップ法である。「通常の遺伝子トラップ」とは、ES 細胞に前記トラップベクターを導入し、ES 細胞内に本来的に存在する内在性遺伝子をトラップすることを意味する。これにより、ES 細胞中の内在性遺伝子は破壊される。なお、この ES 細胞を用いて、後述の遺伝子破壊マウスを作製することが

できる。そして、トラップされた内在性遺伝子（図8、遺伝子 X）を単離した後に、大腸菌の中で部位特異的変異導入法等の方法でこの遺伝子に微細な変異を導入し（図8、遺伝子 X'）、これをプラスミド上で lox66 の下流につなぎ、第2段階の遺伝子トラップを行う（図8）。なお、遺伝子 X に変異を導入するには、Kunkel 法、Gapped duplex 法等の公知の手法又はこれに準ずる方法を採用することができる。例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えば Mutant-K 又は Mutant-G (TAKARA 社製)）などを用いて、あるいは、LA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキット（TAKARA 社）を用いて変異の導入が行われる。

第2段階の遺伝子トラップは、lox66 の下流に連結された内在性遺伝子の変異型（遺伝子 X'）を ES 細胞に導入することを意味する。これにより、第1段階で導入されたトラップベクターの lox71 部位が、第2段階で導入したベクターの lox66 との間で組換えを起こし、「(lox71/66)-(遺伝子 X')-(loxP)」で構成されるカセットを含む改変した遺伝子を導入できる（図8）。

この方法によれば、改変した内在性遺伝子のみならず、ヒト遺伝子で置換することも可能であり、あらゆる遺伝子を導入することができる。これを本発明において可変型遺伝子トラップ法と名付ける。

3. トラップベクターが組み込まれたクローン（ES 細胞）のスクリーニング

遺伝子トラップベクターを ES 細胞に導入しネオ耐性クローンを選別すれば、これらはマウス内在性遺伝子の下流にトラップベクターが組み込まれているクローンであるとみなされる。これらのクローンから DNA を抽出し、サザンブロット法等により解析し、トラップベクターが1コピーのみ組み込まれているクローンを選択する。この選択方法を用いることにより、効率良くマウス遺伝子をトラップしているクローンを選択できることがわかったので、これをスクリーニング系として用いる。

(1) ネオ耐性クローンの単離

本発明において、トラップベクターを ES 細胞に導入するには、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法等が採用される。例えば、トラップベクター100 μ g を電気穿孔法（バイオラッド GenePulser を用い、800V、3 μ F の条件

下)にて0.8mlのリン酸緩衝液中に浮遊させた3000万個のTT2 ES細胞に導入し、200 μ g/mlの濃度のG418存在下で培養する。1週間後に、ネオ耐性クローンを単離する。

遺伝子トラップベクターはES細胞のゲノム上にランダムに組み込まれる。したがって、単にトラップベクターをES細胞に導入しただけでは、必ずしも遺伝子の中に組み込まれるわけではなく、遺伝子とは関係のない場所にも組み込まれる。しかし、トラップベクター内には薬剤耐性遺伝子であるネオ耐性遺伝子がまれているので、それが発現している細胞は、ネオマイシン(G418ともいう)耐性となる。逆に言えば、ネオマイシン存在下で生存する細胞は、ネオ耐性遺伝子を発現していることになる。トラップベクター内のネオ耐性遺伝子は、ES細胞で発現しているマウスの遺伝子の下流に組み込まれないと発現しない。したがって、発現するということは、ある遺伝子の下流に組み込まれたことを意味する。

(2) 組み込みパターンによるESクローンの選別

ESクローンから常法にしたがってDNAを抽出し、サザンブロット法等により組み込みパターンを解析する。サザンブロットのパターンが単一バンドとして現れた場合は、1コピーのみが組み込まれていると判断できるため、そのパターンを表したDNAを選別する。これは、プラスミドによるマウス内在性遺伝子の単離を容易に行なえるクローンを選別するためであり、また、1コピーでネオ耐性となるクローンでは、実際にマウス遺伝子をトラップしている確率が極めて高いからである。

4. キメラ動物作製によるトラップ系統(トランスジェニック動物)の樹立

キメラ動物の作製は標準的な方法で行う(図9)。本発明において作製されるキメラ動物の種類は特に限定されるものではない。例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ等が挙げられる。本発明においては、取り扱いが容易で繁殖もしやすいマウスが好ましい。

ネオマイシンで選別したES細胞を動物由来の桑実胚と凝集させ(ES細胞と桑実胚との集合体を形成させること)、キメラ動物胚(例えば胚盤胞まで発生したも

の)を作製する。これらを不妊雄と交尾し偽妊娠状態となった仮親の子宮に移植する。例えばマウスの場合は約 17 日後に子が生まれるので、仮親から生まれた子のうちキメラ動物を選ぶ。キメラの寄与率が高い動物は、生殖系列の可能性が高いが、キメラ動物を正常動物と交配することにより、生殖系列のキメラ動物であることの確認が可能である。

その後正常な雌と交配し、F1 を得て変異動物系統を樹立する。系統(トランスジェニック動物)樹立ができたもののみについて以下の解析を行なう。なお、F1 からの精子、及び該精子を用いて体外受精を行なって得られる 2 細胞期胚は、超急速凍結法にて凍結保存しておくことができる。

(1) 発現パターンの解析

F1 動物を交配し、胚(例えばマウスの場合 9.5 日目のもの)と成体における発現パターンを解析する。

(2) 表現型の解析

樹立した動物系統について、ヘテロ及びホモ動物の表現型を解析する。表現型の解析は、肉眼的観察、解剖による内部の観察、各臓器の組織切片、X 線撮影による骨格系、行動や記憶、血液を用いて行う。

(3) トラップした遺伝子の単離と構造解析、染色体地図の作成

トラップクローンから DNA の単離と塩基配列の決定を行ない(後述)、ホモロジーサーチを行なう。その結果、得られた配列情報が既知遺伝子、EST、未知遺伝子及びリピートのいずれに属するのか、区別しておく。EST と未知遺伝子については、染色体地図を作成することもできる。染色体地図は、蛍光 in situ hybridization (FISH) 法、またはマイクロサテライトプローブ等を用いた連関解析若しくは放射線照射による雑種細胞を用いた解析によって行なう。染色体上の位置が明らかになれば、既存の変異マウスの位置と対比し、一致するかどうかも調べておく。

(4) データベース構築

樹立した各系統について、マーカー遺伝子の胚(例えばマウスの場合 10 日目の胚)と成体における発現パターン、F1 および F2 動物における表現型、トラップした動物内在性 DNA の塩基配列、EST と未知遺伝子についてはその染色体上の位

置について、データベースを作成する。

5. ノックアウト動物

本発明のノックアウト動物は、遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。その処理方法について説明する。

本発明において使用し得る動物としては、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ等が挙げられる。本発明においては、取り扱いが容易で繁殖もしやすいマウスが好ましい。

未知遺伝子を含むゲノム DNA を、動物 ES 細胞から調製したゲノム DNA から PCR により、又はゲノムライブラリーから得、これに本発明のトラップベクターに組み込む。この操作により、このエクソンの機能は破壊される。これと同時にベクターの中にネガティブ選別用のチミジンキナーゼ (tk) 遺伝子又はジフテリア (DT) 毒素遺伝子を繋げておく。エレクトロポレーション等によりトラップベクターを ES 細胞に導入し、この細胞をポジティブ選別用のネオマイシン及びネガティブ選別用の核酸類似体 FIAU (fluoriodoadenosyluracil)、又はジフテリア毒素の存在下で培養する。この選別によりトラップベクターが挿入された ES 細胞のみが残る。この ES クローンでは、破壊されたエクソンを含む遺伝子がノックアウトされる。得られた細胞を仮親の子宮に移植し、その後生まれるキメラ動物を選ぶ。キメラ動物と正常動物との交配により、ヘテロ接合体動物が得られ、ヘテロ接合体同士との交配によりホモ接合体を得ることができる。

なお、ノックアウトマウスが得られたことの確認は、F1 マウス個体について X 線写真撮影を行い、骨の異常（例えば骨の変形）の有無を観察する。また、外見上の異常の有無及び解剖を行った際の諸組織-臓器の異常を観察することもできる。さらに、組織から RNA を抽出し、ノーザンブロット解析により遺伝子の発現パターンを解析し、必要に応じて血液を採取し、血液検査や血清生化学検査を実施してもよい。

6. 遺伝子の単離、組換えベクターの構築及び形質転換体の作製

(1) 遺伝子の単離

本発明においては、前記の通りトラップされた遺伝子のクローニングを行い、構造解析を行うことができる。

トラップクローンから DNA の単離は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、トラップクロンの mRNA からクローニングする場合は、まず、トラップクローンをグアニジン試薬、フェノール試薬等で処理して全 RNA を得た後、オリゴdT-セルロース又はセファロース 2B を担体とするポリU-セファロース等を用いたアフィニティーカラム法、あるいはバッチ法によりポリ (A)⁺ RNA (mRNA) を得る。得られた mRNA を鋳型として、オリゴdT プライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖 cDNA を合成した後、該一本鎖 cDNA から二本鎖 cDNA を合成する。このようにして得られた二本鎖 cDNA を適当な発現ベクター (例えば λ gt11 等) に組み込むことによって、cDNA ライブラリーを得る。

上記の通り得られた遺伝子について塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定はマキシム-ギルバートの化学修飾法、又は DNA ポリメラーゼを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法等の公知手法により行うことができる。通常は、自動塩基配列決定装置等により塩基配列を決定することができる。また、cDNA の 5' 領域又は 3' 領域の塩基配列が未決定の場合は、5'-RACE 法、3'-RACE 等を用いて全塩基配列の決定を行う。RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法は、当該技術分野において周知であり (Frohman, M. A. et al., Methods Enzymol. Vol. 218, pp340-358 (1993))、RACE を行うためのキットも市販されている (例えば、MarathonTM cDNA Amplification Kit; CLONETECH 社、その他)。

一旦本発明の遺伝子の塩基配列が決定されると、その後は、化学合成によって、又は決定された当該塩基配列から合成したプライマーを用いた PCR によって、本発明の遺伝子を得ることができる。

(2) 組換えベクターの構築

目的とする遺伝子断片を精製し、ベクターDNAと連結する。ベクターとしては、ファージベクター、プラスミドベクター等の任意のものを用いることができる。DNA とベクターとの連結手法は、当該分野で周知である (J. Sambrook, et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等

に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。

(3) 形質転換体

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主は、本発明の DNA を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等が挙げられる。

大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明の遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。大腸菌としては、例えばエッシャー・コリ (*Escherichia coli*) K12、DH1 などが挙げられ、枯草菌としては、例えばバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) などが挙げられる。プロモーターは、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば trp プロモーター、lac プロモーター、PL プロモーター、PR プロモーターなどの、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。tac プロモーターなどのように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌への組換えベクターの導入方法は、細菌に DNA を導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法 (Cohen, S. N. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69:2110-2114 (1972))、エレクトロポレーション法 (Becker, D. M. et al. : Methods. Enzymol., 194: 182-187 (1990)) 等が挙げられる。

酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) などが用いられる。この場合、プロモーターとしては酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば gal1 プロモーター、gal10 プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1 プロモーター、PH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、AOX1 プロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法は、酵母に DNA を導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法 (Hinnen, A. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75: 1929-1933 (1978))、

酢酸リチウム法 (Itoh, H. : J. Bacteriol., 153 : 163-168 (1983)) 等が挙げられる。

動物細胞を宿主とする場合は、COS 細胞、Vero 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞)、マウス骨髄腫細胞などが用いられる。プロモーターとして SR α プロモーター、SV40 プロモーター、LTR プロモーター、EF1 プロモーター、PGK プロモーター、MC1 プロモーター等が用いられ、また、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9 細胞、Sf21 細胞などが挙げられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが用いられる。

図面の簡単な説明

図 1 は、遺伝子部分とそれ以外の部分における両者の機能解析の概念を示す図である。

図 2 は、本発明のトラップベクターの構築法及び遺伝子のトラップ法の概要を示す図である。

図 3 は、loxP の構造を示す図である。。

図 4 は、lox71 と lox66 との組換えを示す図である。

図 5 は、変異型 loxP による DNA 断片の挿入を示す図である。

図 6 は、本発明のトラップベクターを示す図である。

図 7 は、トラップベクター pU-Hachi の構築図である。

図 8 は、2 段階の可変型遺伝子トラップ法を示す図である。

図 9 は、キメラ動物作製によるトラップ系統の樹立の概要を示す図である。

図 10 は、トラップベクターの組み込み位置を示す図である。

図 11 は、マウスの尾骨の屈曲変異を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例 1〕 遺伝子トラップベクター変異体の作製

(1) pU-Hachi トラップベクターの構築

pU-Hachi ベクターは pGT1.8IRES β -geo に由来し、マウス En-2 遺伝子からの SA 配列と、脳筋炎ウイルス由来の IRES 配列に連結した β -geo 配列とを含有する。まず、lox71 の BamHI 断片を pGT1.8IRES β -geo の BglII 部位に挿入した。次いで、ウサギ β -グロビン遺伝子の一部である 180bp の配列、loxP 配列、及びマウスホスホグリセレートキナーゼ-1 (PGK) 由来の poly A 付加シグナルを、ベクター pUC19 の LacZ 配列が除去された改変型ベクターに挿入することにより、プラスミド pEBN-SE7ti を構築した。SP 配列は、トラップベクターの 3' 側を保護するために使用した。プラスミド pEBN-SE7ti の SalI 部位に SA-IRES-lox71- β -geo の SalI 断片を挿入することにより、pU-Hachi を得た。

(2) pU12 トラップベクターの構築

pU12 トラップベクターを構築するために、まず pE3NSE7 の PGK poly(A) シグナルをピューロマイシン耐性遺伝子+PGK poly(A) シグナルに置き換え、さらにその下流の BglII 部位に lox511 を挿入したプラスミドを作製した。そのプラスミドの SalI 部位に pU-Hachi からの SA-IRES-lox71- β -geo の SalI 断片を挿入することにより、pU-12 を得た。

(3) pU17 トラップベクターの構築

まず、pSP73 (Promega) に、lox511、loxP、PGK poly(A) シグナル、lox2272 をこの順で挿入し、プラスミド pSP5PP2 を構築した。次に、pU-Hachi の SA 内に 2 箇所ある BamHI のうち上流の BamHI 部位で切断し、pBluescriptII KS+ プラスミドに、SA 前半の BamHI までの DNA 断片、lox71 配列、SA 後半 BamHI から KpnI までの DNA 断片、 β -geo の NcoI から SalI 部位までをこの順に挿入し、プラスミド pKS+S71A β geo を構築した。この pKS+S71A β geo から lox71 を含む SA- β geo の XbaI 断片を切り出し、これを pSP5PP2 の SpeI 部位に挿入することにより pU-17 を得た。

〔実施例 2〕 ES 細胞クローンの選別

pU-Hachi トラップベクターを用いたエレクトロポレーションにおいては、100 μ g の SpeI で消化した DNA 及び 3×10^7 個の細胞を用いた。細胞を 0.8ml の PBS に懸濁し、Bio-Rad Gene Pulser を用いて、800V、3 μ F の条件でエレクトロポレーションを行った。48 時間後、200 μ g/ml の G418 の存在下で培養した。選別を 7 日間維持し、コロニーを 24 ウェルプレートにまいて増殖させ、凍結保存した。トラップクロンをサザンブロッティングにより解析し、単一コピーの組み込みパターンを示す細胞株を選別した。

トラップクロンから β -geo 配列を除去するため、pCAGGS-Cre (Araki, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:160-164, 1995; Araki, K. et al., Nucl. Acids Res., 25:868-872, 1997; Araki, K. et al., J. Biochem. Tokyo, 122: 977-982, 1997) を環状の形態でエレクトロポレーションにより導入した。細胞数が 1.5×10^7 個、PBS 容量が 0.4ml であることを除き上記と同一の条件でエレクトロポレーションを行った。

処理された細胞の半分を 1 枚の 100mm プレートにまき、48 時間増殖させた。次に、 1×10^3 個/プレートの濃度で 100mm のプレートに再度まき、コロニーを形成させた。1 週間後、コロニーを取り上げ、DNA 調製のために増殖させた。

トラップベクターの lox71 部位に組み込みが行われるよう設計した共エレクトロポレーションを行うため、20 μ g の各プラスミド (p66²IEGPPac, p66²INZPPac 又は p66PGKPac-5) 及び pCAGGS-Cre を環状形態で使用した。

なお、プラスミド p66PGKPac-5 は、lox66 断片及び PGK プロモーター-ピューロマイシン耐性遺伝子コード配列を、pSP73 ベクター (Promega) に挿入することにより構築した。プラスミド p66²IEGPPac は、pSP73 ベクター (Promega)、IRES 配列、EGFP 遺伝子 (Clontech)、PGK プロモーター、Pca 遺伝子及び lox66 配列から構築した。プラスミド p66²INZPPac は、p66²IEGPPac の EGFP 遺伝子を、SV40 ラージT 遺伝子由来の核局在シグナルと融合した lacZ 遺伝子で置換することにより構築した。

PBS 中、 1×10^7 個/0.8ml の細胞をエレクトロポレーションにかけた (200V, 950 μ F)。48 時間後、2 μ g/ml のプロマイシンを用いて 3 日間選別にかけ、その後通常の培地に細胞を移した。エレクトロポレーション後 9 日目にコロニーを取り上

げ、増殖させた。

公知方法 (Abe, K., Niwa, H. et al., Exp. Cell Res. 229: 27-34, 1996) に従って胚様体 (EB) の生産を行った。ES 細胞中の β -ガラクトシダーゼ活性及び EB は、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル β -D-ガラクトピラノシド (X-gal) で染色することにより測定した (Gossler, A. and Zachgo, J., Gene Targeting: A Practical Approach, Joyner, A. (ed.), Oxford University Press, Oxford, 1993, pp. 181-227)。

トラップベクター pU-Hachi を直鎖状にして TT2 ES 細胞に導入した結果、109 個のクローンを単離した。各クローンからゲノム DNA を調製し、pUC プローブ及び少なくとも 3 つの制限酵素を用いてサザンブロッティングを行い、組み込みパターンを検討した。

69% のクローンにおいて単一バンドが確認された。lox71 部位の存在は Cre 媒介組み込みに不可欠であるため、LacZ プローブを用いたサザンブロッティング及び PstI 消化により、その存在を確認した。その結果、10% のクローンが lox71 部位を欠失していた (表 4)。シングルコピーが組み込まれ、かつ lox71 部位が保持されている残り 59% のクローンを、さらに解析するために選択した。

表 4

	単一コピーの組み込み (%)			マルチコピーの組み込み (%)	
	lox71 部位を保持するクローン		lox71 部位を保持しないクローン		
	プラスミド起源を保持する	プラスミド起源を保持しない		2~3 コピー	5 コピー以上
クローンの総数 (%)					
109 (100)	24 (22)	40 (37)	11 (10)	26 (24)	8 (7)

トラップベクターによる内在性遺伝子の捕獲を評価するため、胚様体形成の前後に X-gal で染色した。表 5 に示す通り、97% のクローンが分化の特定のステージに β -gal 活性を示した。このことは、pU-Hachi トラップベクターを使用すると、他の IRES- β -geo ベクターのように有効な遺伝子トラップが行われることを意味する。

表 5

クローン番号 (%)	β -geo 発現	
	未分化 ES 細胞	分化した胚様体 (8 日)
26 (41)	+	+
32 (50)	-	+
4 (6)	+	-
2 (3)	-	-

〔実施例 3〕 クローンの選択頻度

トラップベクターが 1 コピーのみが組み込まれているクローンを選択するため、選別された neo 耐性クローンから DNA を抽出し、サザンブロット法により解析した。

細胞を SDS/プロテインアーゼ K で溶解し、フェノール/クロロホルム (1:1) (vol/vol) を用いて 2 回処理した。続いてエタノール沈殿を行い、TE バッファー (10mM Tris-HCl, pH7.5/1mM EDTA) に溶解した。6 μ g のゲノム DNA を適当な制限酵素で消化し、0.9%アガロース電気泳動を行った後、ナイロン膜 (Boehringer Mannheim) 上にブロットした。ハイブリダイゼーションは、DIG DNA Labelling and Detection Kit (Boehringer Mannheim) を用いて行った。

PCR 解析は、以下の反応組成液を用いて、94℃で 1 分、55℃で 2 分及び 72℃で 2 分の反応を 1 サイクルとしてこれを 28 サイクル行った。

PCR に使用したプライマーは以下の通りである。

 β -geo 検出用プライマー

Z1 (フォワード) : 5'-gcgttacccaacttaatcg-3' (配列番号 7)

Z2 (リバーズ) : 5'-tgtgagcgagtaacaacc-3' (配列番号 8)

pUC ベクター配列の複製起点領域の配列検出用プライマー

Ori2 (フォワード) : 5'-gccagtggcgataagtcgtgtc-3' (配列番号 9)

Ori3 (リバーズ) : 5'-cacagaatcaggggataacgc-3' (配列番号 10)

反応組成液

10×PCR バッファー	2 μ l
10mM dNTP	0.2 μ l
フォワードプライマー (100pmol/ μ l)	0.2 μ l
リバースプライマー (100pmol/ μ l)	0.2 μ l
AmpliTaQ DNA ポリメラーゼ (Perkin Elmer)	0.2 μ l
全量 (滅菌蒸留水で調整)	20 μ l

PCR 反応産物の 2 分の 1 量をアガロースゲルにロードし、解析した。

プラスミドレスキュー (トラップした遺伝子の回収) は、以下の通り行った。

ゲノム DNA (20 μ g) を適当な制限酵素で処理し、400 μ l の反応溶液中で連結し、環状分子を得た。フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行った後、DNA を 10 μ l の TE に懸濁し、DNA 溶液の半量を用いて、エレクトロポレーションにより大腸菌 (*E. coli* STBL2; Life Technologies) を形質転換した。なお、エレクトロポレーションは、Bio-Rad 社の Gene Pulser を使用説明書に従って行った。エレクトロポレーション後の細胞を 1ml の Circle Grow 培地 (BI0101) 中、30℃ で攪拌しながら 1 時間インキュベートした。次に、サンプルを濃縮した後 LB/agar プレートにまき、アンピシリンによるプラスミドの選別を行った。レスキューされたプラスミドについて、制限酵素地図解析及び配列決定を行った。配列は、Thermo Sequenase Fluorescent-Labeled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham) を用いて決定した。

その結果、表 6 に示す通り、高頻度で組換えを起こしたクローンを得ることができた。

表 6

トラップ クローン	解析した サブクローン の数	組換えを起 こしたサブク ローンの数	組換え 頻度 (%)	プラスミドレスキュー で得られた5'フランキ ング領域の長さ(kb)	プラスミドレスキュー で得られた3'フランキ ング領域の長さ(kb)
Ayu8-003	23	15	65	75	53
Ayu8-016	20	2	10	3.8	4.5
Ayu8-025	23	16	70	1.8	6.5
Ayu8-104	12	5	42	3.5	7
Ayu8-108	12	6	50	5	6

〔実施例 4〕 キメラマウスの作製及び遺伝子解析

(1) マウスへのクローン導入

トラップした ES クローンを、ICR マウス由来の 8 細胞期胚と凝集させ、1 晩培養した。翌日、ES 細胞と 8 細胞期胚とが凝集し合い 1 つの胚盤胞へと発生したものを選択した。これらのキメラ胚約 20 個を不妊雄と交尾した雌（仮親）の子宮の中へ移植した。約 17 日後に出生し、性成熟する生後 8 週以降にキメラマウスを雌マウスと交配し、ES クローン由来の F1 マウス個体を得た。

(2) 表現型の解析

F1 マウス個体について X 線写真撮影を行い、骨の異常の有無を観察した。

(3) トラップした遺伝子の解析

トラップされた遺伝子は β geo との融合 mRNA を作っているはずであるので、このことを利用してトラップされた遺伝子を同定した。

F1 個体マウスで X-gal 染色陽性であった組織より mRNA を抽出し、SA 内の配列のプライマーを用いてサーモスクリプト RT-PCR システム (GIBCO BRL) で 1 本鎖 cDNA を合成し、続いて 5' RACE システム (GIBCO BRL) を用いて、SA のエクソン部がつながる、上流のトラップした遺伝子部分の cDNA 断片を得た。得られた断片はプラスミドベクターにクローニングし、塩基配列を決定した。

(4) 結果

トラップした遺伝子の解析を行った結果の一例を表 7 に示す。

表 7

	クローン番号	遺伝子	表現型
1	Ayu8-R38	Sp1	
2	Ayu8-029	PCM1 (pericentriol material 1)	
3	Ayu3-008	Cyclin B2	
4	Ayu6-003	大腸菌の Ftsj1 遺伝子の 相同物	
5	Ayu8-003	dynammin II	胚致死
6	Ayu8-R16	sui1	
7	Ayu8-016	hnRNP L の上流	
8	Ayu8-019	RNA ポリメラーゼ I	
9	Ayu8-108	importin β	
10	Ayu8-021	不明	Kinky tail

上記の通り得られた遺伝子のうち PCM1 遺伝子の解析を行った結果、配列番号 11～13 に示す配列（5'-RACE 部分断片）が得られた。これは、公知の PCM1 遺伝子の配列の一部と一致した。また、Ayu8-021 クローンから得られたマウスは尾骨が屈曲する変異（kinky tail）が生じていた（図 11）。この変異遺伝子断片の配列を決定した結果、配列番号 14 に示すものであった。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、そのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

産業上の利用可能性

本発明により、遺伝子トラップベクター、及び遺伝子のトラップ法が提供される。本発明によれば、まず、(1) 効率良く遺伝子破壊マウスを作製することができる。トラップベクターのマウス遺伝子への組み込みにより、ほとんどの場合マウス遺伝子は破壊される。したがって、この ES 細胞を利用すれば、マウス遺伝子の破壊マウスを作製できることになる。すなわち、ネオ耐性クローンの選択と 1 コピーのトラップベクターの組み込みクローンの選別により、効率良く遺伝子破壊マウスを作製できることになる。通常の相同組換えによる方法では、1 人の研究者が 1 年間にせいぜい 4 遺伝子の破壊マウスしかできない。本発明の方法によれば、例えば 1 週間に 6 系統樹立し、1 年間に 40 週間働いたとすると、合計 240 系統も樹立できる。従って、上記例の場合は、本発明の方法は通常の方法と比較して 60 倍の効率である。

(2) 詳細な遺伝子機能の解析ができる

本発明のトラップ法では、予め機能を持つと思われる遺伝子の各部分に変異を導入しておいて、この変異型遺伝子をトラップベクターに組み込み、その後で、変異遺伝子が組み込まれたトラップベクターをマウスに導入し、その表現型を解析することができる。

(3) よりヒトに近い疾患モデルマウスを作製することができる。

ヒトの疾患で発見されたのと同じ突然変異を持つヒト遺伝子をマウス遺伝子に置換して導入できるので、よりヒトに近い疾患モデルマウスを作製することがで

きる。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 : 合成 DNA

配列番号 2 : 合成 DNA

配列番号 3 : 合成 DNA

配列番号 4 : 合成 DNA

配列番号 5 : 合成 DNA

配列番号 6 : 相同組換え配列

配列番号 7 : 合成 DNA

配列番号 8 : 合成 DNA

配列番号 9 : 合成 DNA

配列番号 10 : 合成 DNA

参考文献

(1) 遺伝子トラップに関連したもの

- 1) Wurst, W. et al., Genetics 139: 889-899, 1995.
- 2) Chowdhury, K. et al., Nucleic Acids Res. 25:1531-1536, 1997.
- 3) Hicks, G. G. et al., Nature Genetios 16: 338-344, 1997.
- 4) Zambrowicz, B. P. et al., Nature 392: 608-611, 1998.

(2) Cre-loxP に関連したもの

- 1) Sauer, B. and Henderson, N. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5166-5170, 1988.
- 2) Lakso, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236, 1992.
- 3) Gu, H. et al., Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced 1993.
- 4) Albert, H. et al., Plant J. 7: 649-659, 1995.
- 5) Schwenk, F. et al., Nucleic Acids Res. 23: 5080-5081, 1995.

(3) 遺伝子トラップ関連文献リスト

- 1) Miyazaki, J. et al., Gene 79: 269-277, 1989.
- 2) Niwa, H. et al., Gene 108: 193-200, 1991.
- 3) Niwa, H. et al., J. Biochem. 113: 343-349, 1993.
- 4) Niwa, H. et al., Gene 169: 197-201, 1996.
- 5) Abe, K., Niwa, H. et al., Exp. Cell Res. 229: 27-34, 1996.
- 6) Araki, K. et al., Nucleic Acid Res. 25: 868-872, 1997.
- 7) Araki, K. et al., J. Biochem. 122: 977-982, 1997.
- 8) Oike, Y. et al., Human Mol. Genet-In Press
- 9) Oike, Y. et al., Blood in press

請求の範囲

1. 逆反復配列 1、スペーサー配列及び逆反復配列 2 の順で構成される loxP 配列のうち逆反復配列 1 の一部の配列に変異が導入された変異型 loxP を含むトラップベクター。
2. 変異型 loxP が lox71 である請求項 1 記載のトラップベクター。
3. lox71 が配列番号 1 に示されるものである請求項 2 記載のトラップベクター。
4. 逆反復配列 1、スペーサー配列及び逆反復配列 2 の順で構成される loxP 配列のうち逆反復配列 2 の一部の配列に変異が導入された変異型 loxP を含むトラップベクター。
5. 変異型 loxP が lox66 である請求項 4 記載のトラップベクター。
6. lox66 が配列番号 2 に示されるものである請求項 5 記載のトラップベクター。
7. 以下の (a) ~ (h) のトラップベクター。
 - (a) SP-SA-lox71-IRES-M-loxP-PV-SP
 - (b) SP-lox71-IRES-M-loxP-PV-SP
 - (c) SA-lox71-IRES-M-loxP-pA-PV-SP
 - (d) SA-lox71-IRES-M-loxP-puro-pA-PV-SP
 - (e) lox71-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
 - (f) lox71-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
 - (g) (lox71 が組み込まれた SA)-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
 - (h) (lox71 が組み込まれた SA)-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
 - (i) (lox71 が組み込まれた SA)-M-loxP-pA-lox2272-プロモーター-M-lox511-SD(SP は任意配列を、SA はスプライスアクセプターを、SD はスプライスドナーを、IRES は分子内リボソームエントリー部位を、M はマーカー遺伝子を、puro はを、pA はポリ A 配列を、PV はプラスミドベクターを表す。)
8. プラスミドベクターが pBR、pUC、pSP 及び pGEM からなる群から選択されるいずれか 1 つである請求項 7 記載のトラップベクター。
9. 請求項 1 記載のトラップベクターと請求項 4 記載のトラップベクターとが組換えを起こしたベクター。

10. 他の loxP との間で組み換えが起こらないものである請求項9記載のベクター。
11. 請求項1～8のいずれかに記載のトラップベクターを胚幹細胞に導入することを特徴とする遺伝子トラップ方法。
12. 請求項1～8のいずれかに記載のトラップベクターが導入された胚幹細胞。
13. 請求項1～8のいずれかに記載のトラップベクターが導入されたトランスジェニック動物。
14. 動物が、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、ヒツジ及びヤギからなる群から選択されるいずれか1種である請求項13記載のトランスジェニック動物。
15. 請求項12記載の胚幹細胞を動物に導入することを特徴とするトランスジェニック動物の作製方法。
16. 請求項1～8のいずれかに記載のトラップベクターが導入されたノックアウト動物。
17. 動物が、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、ヒツジ及びヤギからなる群から選択されるいずれか1種である請求項16記載のノックアウト動物。
18. 請求項12記載の胚幹細胞を動物に導入することを特徴とするノックアウト動物の作製方法。

図 1

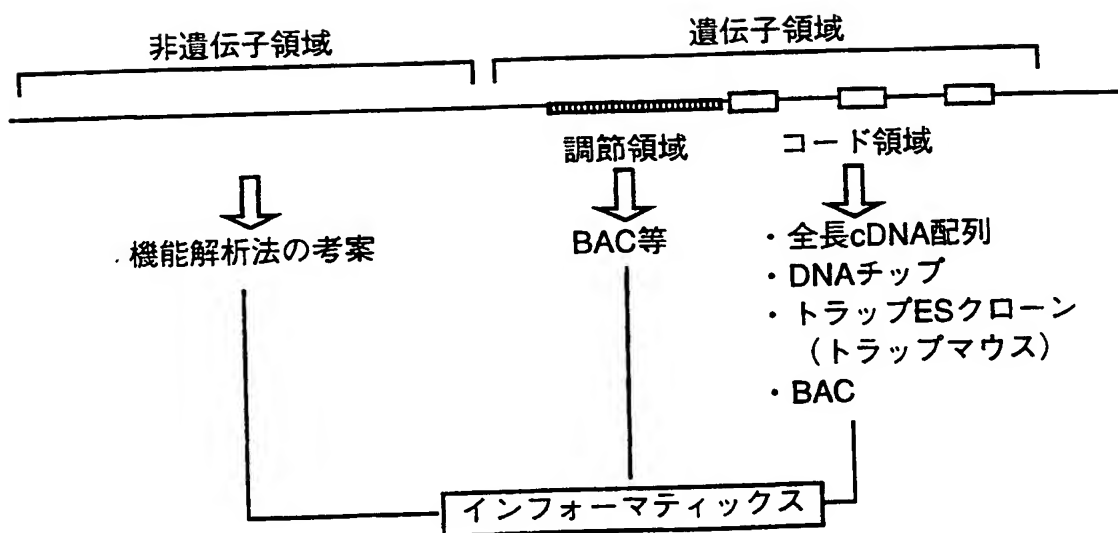


図 2

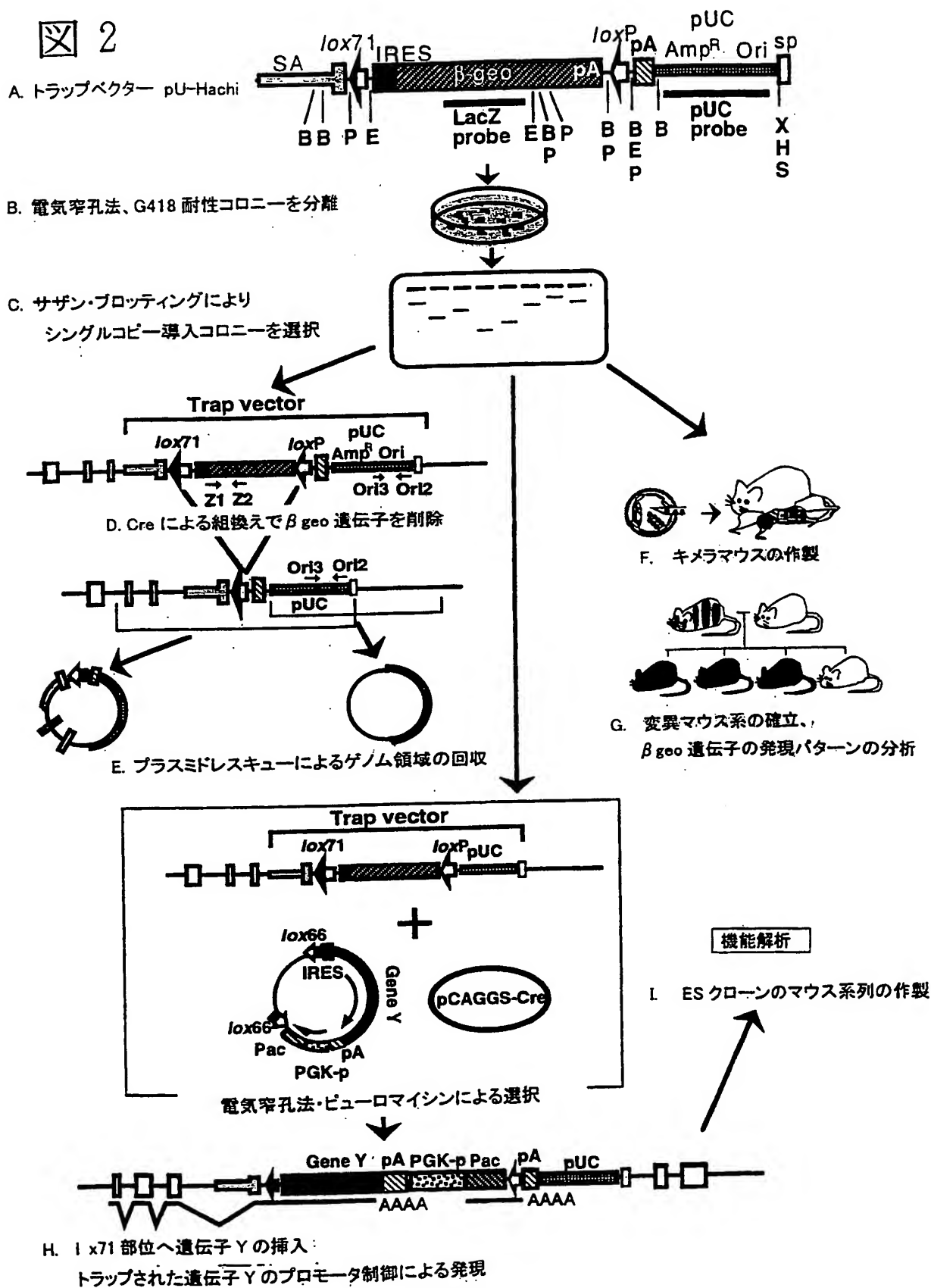
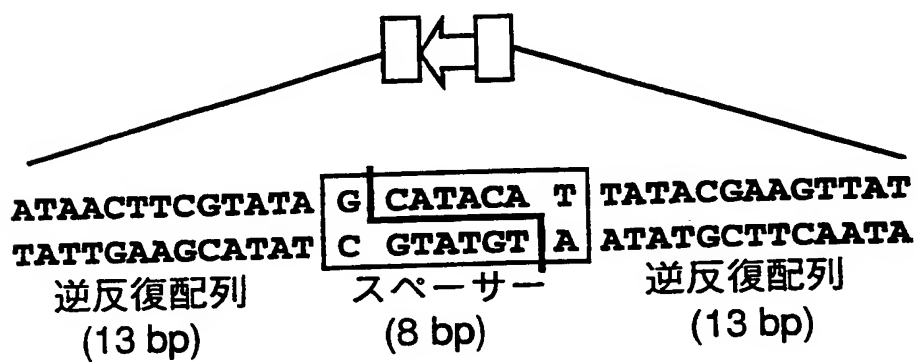


図 3



4

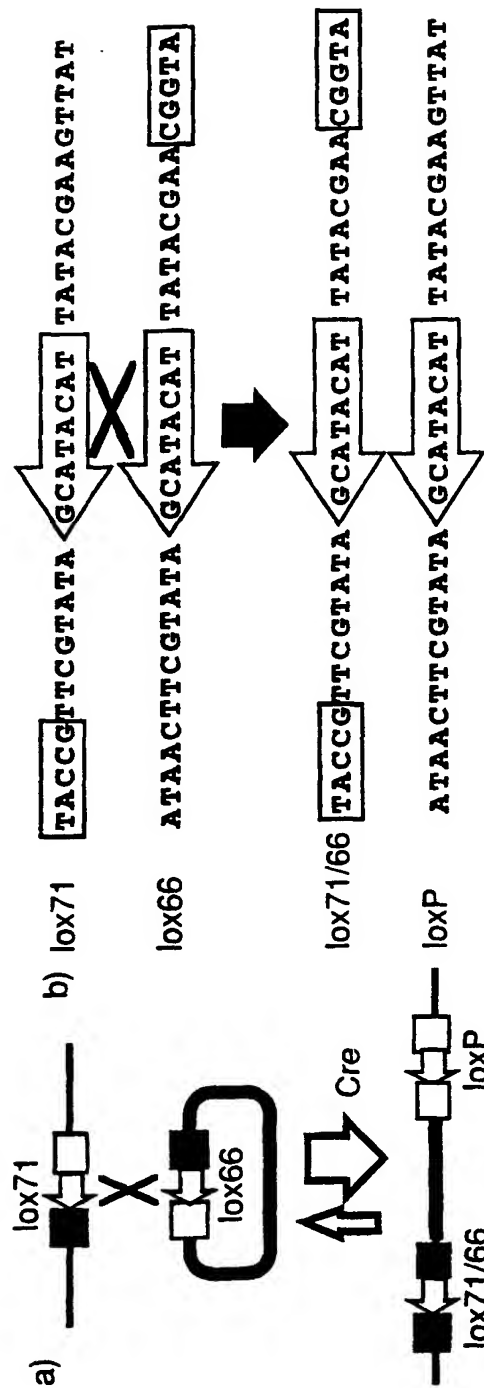
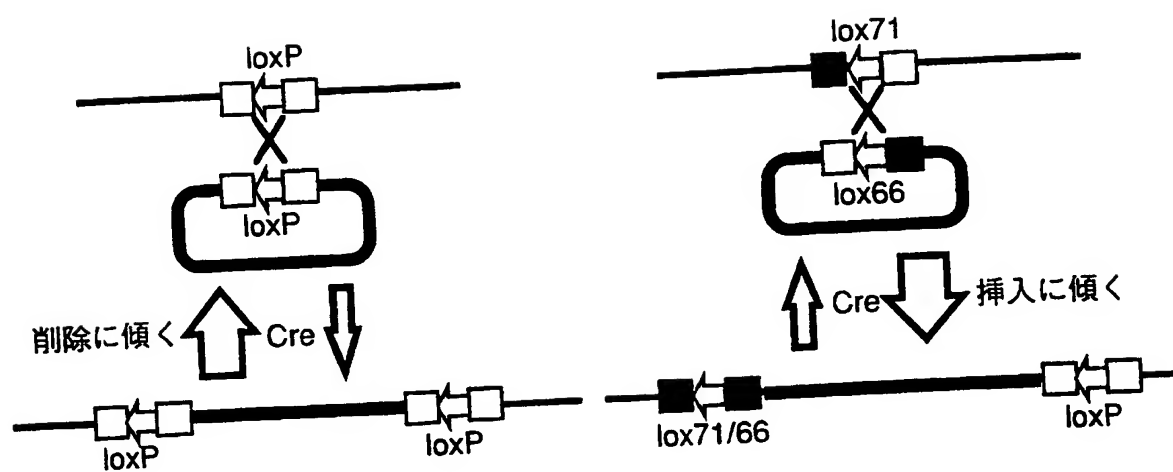


図 5



6

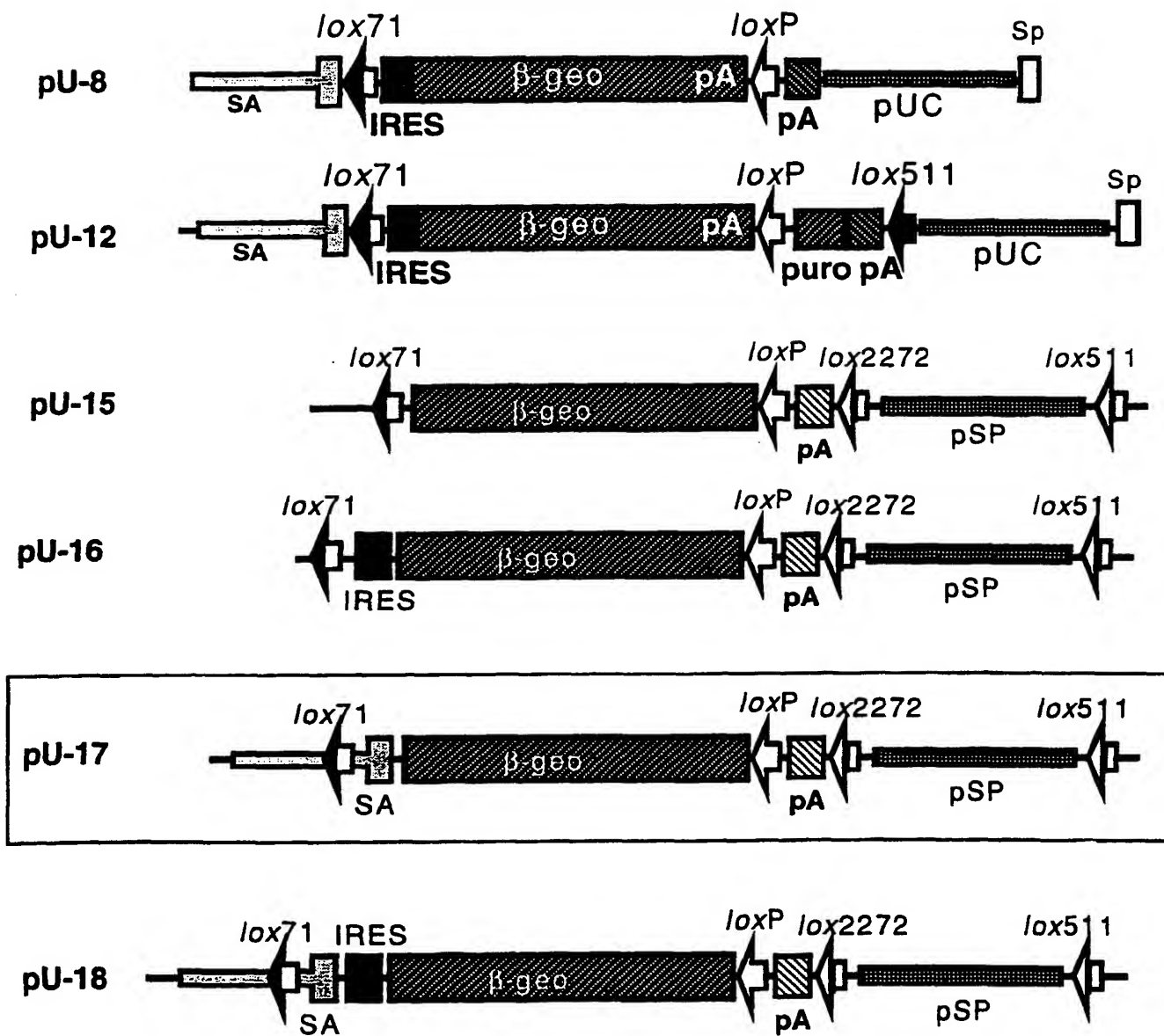


図 7

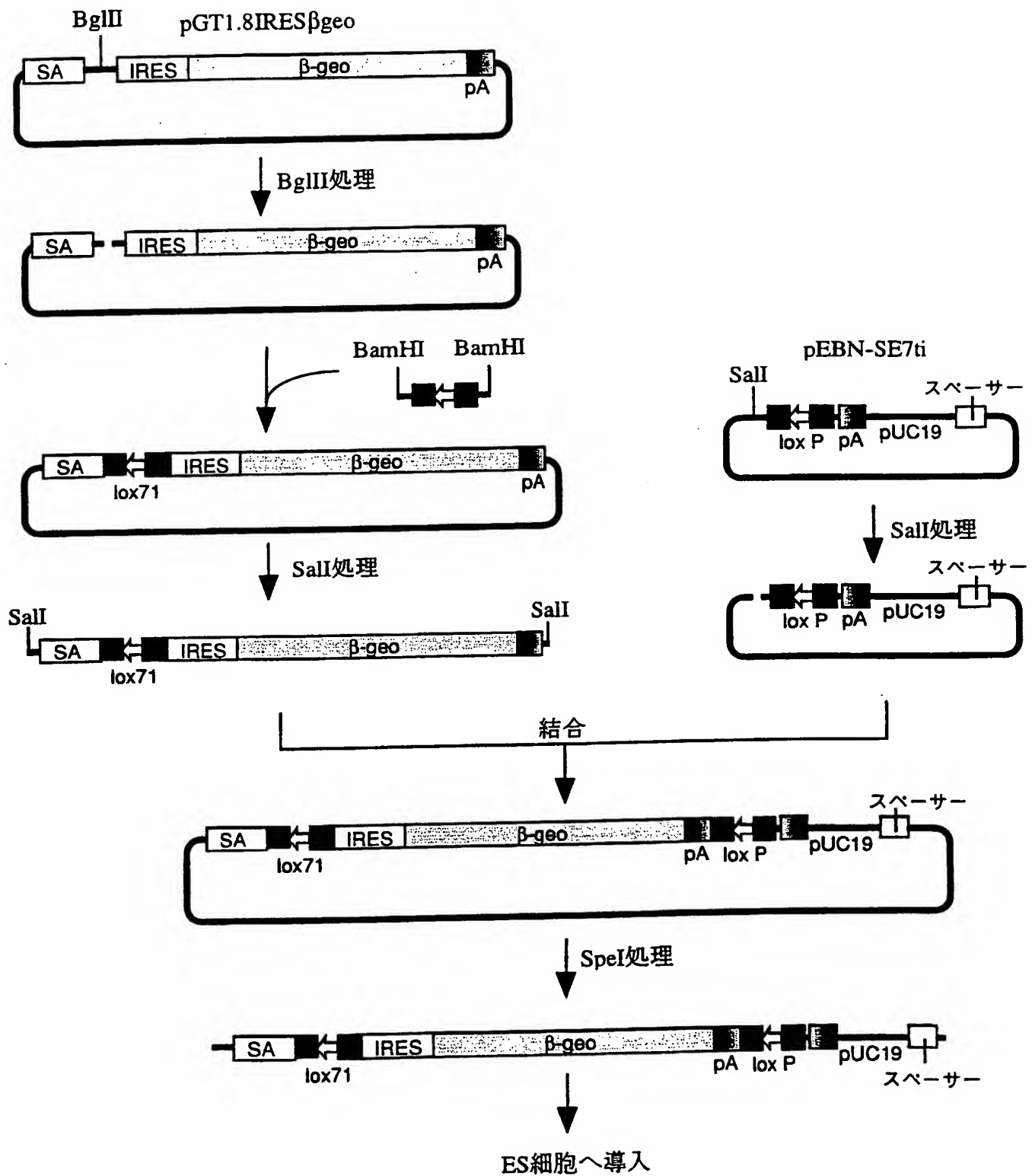


図 8

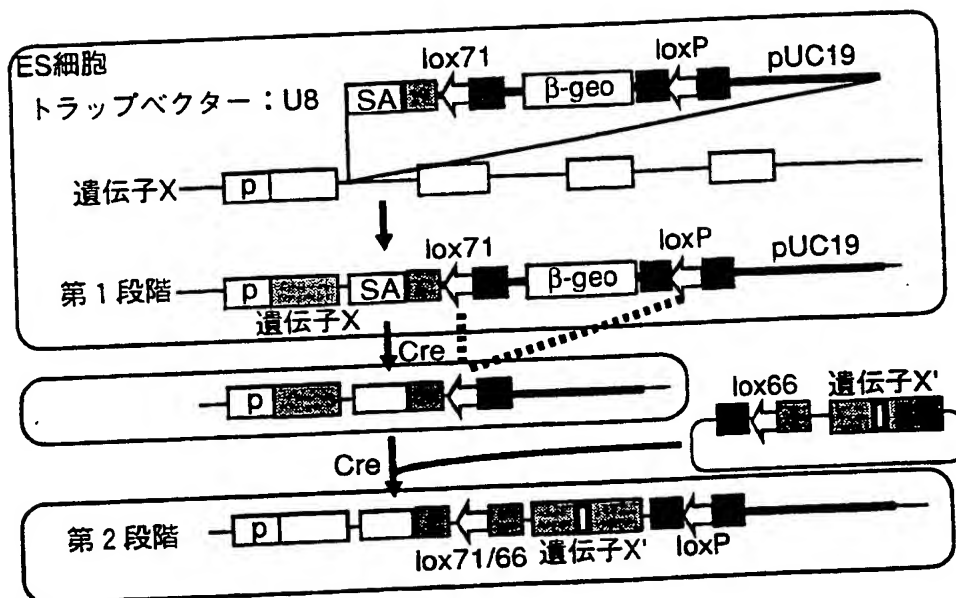
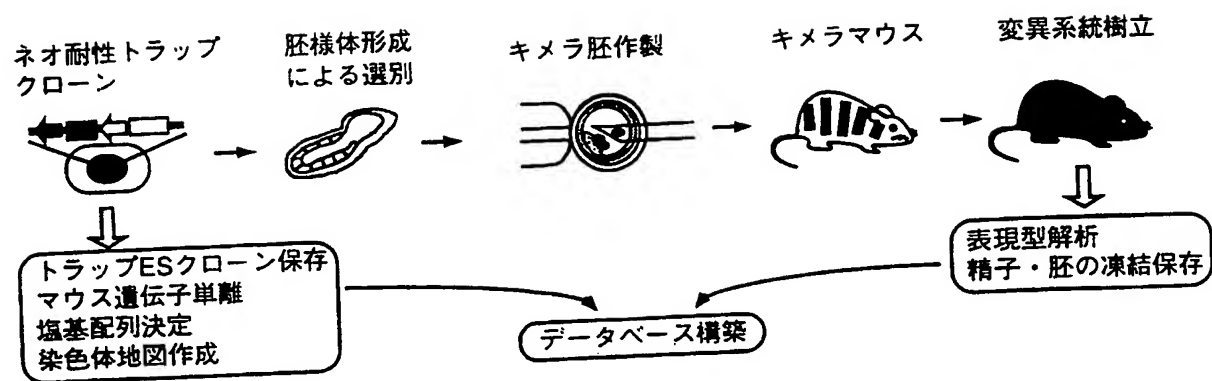


図 9



☒ 1 0

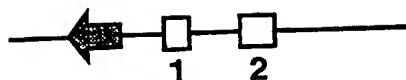
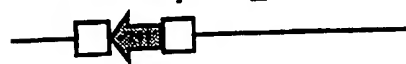
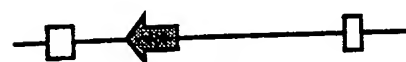
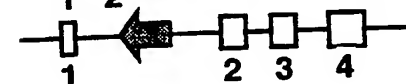
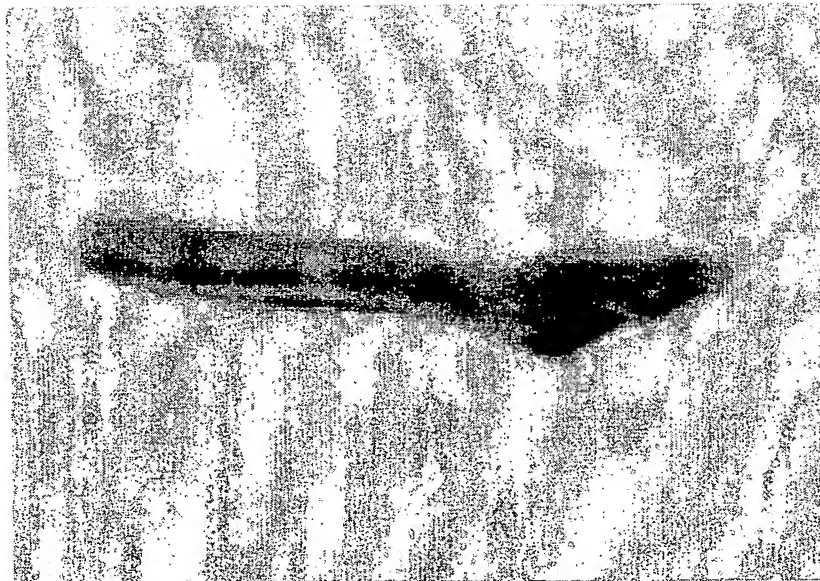
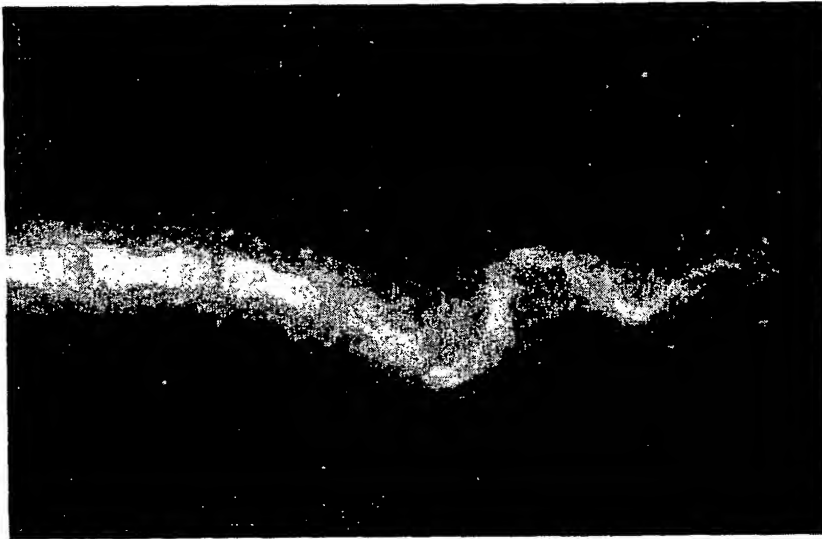
Promoter **Sp1 (Ayu8-38)****Exon** **Crk (Ayu8-104)****Intron** **CBP (Ayu3-112)****Cyclin B2 (Ayu3-8)****Ftsj1 (Ayu6-03)****sui1 (Ayu8-16)**

図 1 1



Ayu8021 のテイルの異常

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> KUMAMOTO TECHNOLIS FOUNDATION

<120> TRAPVECTOR

<130> PH-976PCT

<150> JP99/200997

<151> 1999-07-14

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 1

taccgttcgt ata

13

<210> 2

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 2

tatacgaacg gta

13

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 3

ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat

34

<210> 4

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 4

ataacttcgt ata

13

<210> 5

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 5

tatacgaagt tat

13

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> Other

<220>

<223> Homologous recombination sequence

<400> 6

taccgttcgt atagcataca ttatacgaac ggta

34

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 7

gcgttaccca acttaatcg

19

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 8

tgtgagcgag taacaacc

18

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

gccagtggcg ataagtcgtg tc

22

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 10

cacagaatca ggggataacg c

21

<210> 11

<211> 400

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 11

```

agaaacttaa acagcggata aacttcagtg atttanaica gagaagtatt ggaagtgatt 60
ctcaaggtaa agcaacagcg gctaacaaca aacgtcagct tagigaaaac cgaaagccct 120
tcaacttttt gcctatgcag attaatacta acaagagcaa ggatgctact gcaagtcttc 180
caaagagaga gatgacaacg tcagcacagt gcaaagagtt gtttgcttct gctctaagta 240
atgacctttt gcaaaactgt caatctctga agaagatggg agaggggagc ctgcatggga 300
aacaccagat tgtaagcagg ctgtttcaat cctgactata ttactaaagc tagttctatg 360
cnanaagttt tgtaaanana atgaaagtct gcaatgttga 400

```

<210> 12

<211> 416

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

```

tcttctagct ttgcagcata aagcagagca agctatnagc tgtgatggat gactctgttg 60
ttacagaaac tacaggaagc ttatctggag tcagcatcac atctgaacta aatgaagaac 120
tgaatgattt aattcagcgt ttccataatc agcttcgtga ttctcagcct ccagcgttc 180
cagacaacag aagacaggca gaaagtcttt cattaaactag agagatttct cagagcagaa 240
atccctcagt ttctgaacat ttacctgatg agaaagtaca gctttttagc aaaatgagag 300
tactacagga aaagaacaag aaatggacaa attagttggg agaacttcat aaccttcgag 360
atnagcatct gaacaactca tcatittgtgc cntcaacttc ncnccaaaga agtggg 416

```

<210> 13

<211> 484

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 13

gtttctacac ctactgaaca gcagcagcca tttagctcaa aatccttnca gggnaaaaca 60
 gagtatatgg cttttccaaa accctctgna aagcagttct tctcttggag cagaaaagca 120
 aaggaatcaa gaaacagccc gaagaggaag ctgaaaacac taagacacca tggttatatg 180
 atcaagaagg tggagtagaa aaaccatttt tcaagactgg atttacagag tctgtagaga 240
 aagntacaaa atagtancgg caaaaatcaa ccagatacaa gcaggagaag acgtcgggtt 300
 gatgaagaat cccttggaaa gctttagcag tatgcctgat cctatagacc caacatcagt 360
 aactaaaaca tttaaaacaa gaaaagcatc tgcccaggcc agcctggcct ctaaggacaa 420
 aactccaaa tcaaagagta agaagaggat tctactcagc tgaaaagtag agttaaaaat 480
 attg 484

<210> 14

<211> 211

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

ctgtctgtca ttgtcgttct ccittagaag gcagaaaaga aatgggaaga aaaaaggcaa 60
 aatctggaac actataacgg aaaggagttc gagaagctcc tggaggaagc tcaggccaac 120
 atcatgaagi caatccaaa cctggagatg cccccagctt ccagcccagt gtcaaaggga 180
 gatgcggcag gggataagct ggagctgtca g 211

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02916

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N 15/85, A01K 67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/85, A01K 67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneSeq/DDBJ/GenBank/EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ARAKI K. et al., "Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells", Nucleic Acids Research (1997), Vol.25, No.4, pp.868-872	1-18
A	ARAKI K. et al., "Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters", Journal of Biochemistry (1997), Vol.122, No.5, pp.977-982	1-18
A	IRMGARD S. et al., "Selective disruption of genes transiently induced in differentiating mouse embryonic stem cells by using gene trap mutagenesis and site-specific recombination", Molecular and Cellular Biology (1998), Vol.18, No.5, pp.3081-3088	1-18
A	LI Z. et al., "Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells", Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America (1996), Vol.93, No.12, pp.6158-6162	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
21 June, 2000 (21.06.00)

Date of mailing of the international search report
04 July, 2000 (04.07.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N 15/85, A01K 67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N 15/85, A01K 67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GeneSeq/DDBJ/GenBank/EMBL

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ARAKI K., et al. "Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells", Nucleic Acids Research (1997), Vol. 25, No. 4, p. 868-872	1-18
A	ARAKI K., et al. "Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters", Journal of Biochemistry(1997), Vol. 122, No. 5, p. 977-982	1-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.06.00

国際調査報告の発送日

04.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N

9152

電話番号 03-3581-1101

内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	IRMGARD S., et al. "Selective disruption of genes transiently induced in differentiating mouse embryonic stem cells by using gene trap mutagenesis and site-specific recombination", Molecular and Cellular Biology(1998), Vol. 18, No. 5, p. 3081-3088	1-18
A	LI Z., et al. "Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells", Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America(1996), Vol. 93, No. 12, p. 6158-6162	1-18

127
1
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH-976-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/02916	International filing date (day/month/year) 02 May 2000 (02.05.00)	Priority date (day/month/year) 14 July 1999 (14.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/85, A01K 67/027		
Applicant TRANSGENIC INC.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
- These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 26 May 2000 (26.05.00)	Date of completion of this report 07 September 2000 (07.09.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02916

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1 to 18

The inventions described in claims 1 to 18 involve both novelty and an inventive step with respect to the documents cited in the ISR.

None of the documents cited in the ISR describes a trap vector containing a mutated loxP in which -- in the loxP sequence consisting of a reverse repetitive sequence 1, a spacer sequence, and a reverse repetitive sequence 2 in this order -- a mutation is transferred into a part of the reverse repetitive sequence 1. Nor could one skilled in the art have easily conceived such an idea.



P.B.5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

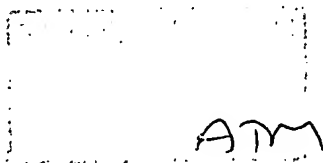
European
Patent Office

Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

Maschio, Antonio
D Young & Co,
21 New Fetter Lane
London EC4A 1DA
GRANDE BRETAGNE



Datum/Date

13.06.02

Zeichen/Ref./Réf.

P013273EP ATM

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°./Patent Nr./Patent No./Brevet n°.

00922969.1-2405-JP0002916

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire

Transgenic Inc.

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.





European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
PARTIAL EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number

which under Rule 45 of the European Patent Convention shall be considered, for the purposes of subsequent proceedings, as the European search report

EP 00 92 2969

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
P, X ①	ARAKI K ET AL: "EXCHANGEABLE GENE TRAP USING THE CRE/MUTATED LOX SYSTEM" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 45, no. 5, July 1999 (1999-07), pages 737-750, XP000877476 ISSN: 0270-7306 * the whole document * ---	1-18	C12N15/85 A01K67/027
X ②	WO 99 02719 A (ONG CHRISTOPHER J ; UNIV BRITISH COLUMBIA (CA); JIRIK FRANK R (CA);) 21 January 1999 (1999-01-21) * page 26, line 35 - page 27, line 1 * * page 30, line 8 - line 31; figure 4 * --- -/--	1-6,9-18	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)
			C12N
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
INCOMPLETE SEARCH			
The Search Division considers that the present application, or some or all of its claims, does/do not comply with the EPC to such an extent that a meaningful search into the state of the art cannot be carried out, or can only be carried out partially, for the following claims: Claims searched completely : Claims searched incompletely : Claims not searched : Reason for the limitation of the search: see sheet C			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 6 June 2002	Examiner van Heusden, M
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

1
EPO FORM 1503 03.82 (P04C20)



DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.CI.7)
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	
A	KUHN R ET AL: "Advances in gene targeting methods" CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, XX, (3) vol. 9, no. 2, April 1997 (1997-04), pages 183-188, XP004327249 ISSN: 0952-7915 * page 183, right-hand column, line 10 - line 12 *	1-18	
A	ALBERT H ET AL: "Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome" PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, (4) vol. 7, no. 4, 1995, pages 649-659, XP002097329 ISSN: 0960-7412 * the whole document *	1-18	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.CI.7)
A	ZAMBROWICZ AND G A FRIEDRICH B P: "Comprehensive mammalian genetics: history and future prospects of gene trapping in the mouse" (5) INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY, UNIVERSITY OF THE BASQUE COUNTRY PRES, LEIOA, ES, vol. 42, 1998, pages 1025-1036, XP002111634 ISSN: 0214-6282 * the whole document *	1-18	



Although claims 15 and 18 are directed to a method of treatment of the human/animal body (Article 52(4) EPC), the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Claim(s) searched completely:
1-10, 14, 17

Claim(s) searched incompletely:
11-13, 15, 16, 18

Reason for the limitation of the search (non-patentable invention(s)):

The subject matter of claims 11-13, 15, 16 and 18 comprises the use of human embryonic stem cells, and the production of transgenic humans, which contravenes Article 53 EPC in combination with Rule 23(d)(b and c) EPC. These claims have been searched insofar as they relate to non-human embryonic stem cells or non-human animals.

EP 00 92 2969

06-06-2002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9902719 A	21-01-1999	WO 9902719 A1	21-01-1999
		EP 1003893 A1	31-05-2000

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[P C T 36条及びP C T規則70]

REC'D 22 SEP 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 PH-976-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/02916	国際出願日 (日.月.年) 02.05.00	優先日 (日.月.年) 14.07.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ⁷ C12N 15/85, A01K 67/027		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社トランスジェニック		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT 36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎II ☐ 優先権III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ PCT 35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☐ ある種の引用文献VII ☐ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 26.05.00	国際予備審査報告を作成した日 07.09.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり 印	4 N 9152
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
☐ 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
☐ 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-18	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-18	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-18	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1-18

請求の範囲 1-18 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献に対して新規性及び進歩性を有する。

国際調査報告で引用されたいずれの文献にも、逆反復配列 1、スペーサー配列及び逆反復配列 2 の順で構成される 1 o x P 配列のうち逆反復配列 1 の一部の配列に変異が導入された変異型 1 o x P を含むトラップベクターが記載されておらず、しかも、その点は当業者といえども容易に想到し得ないものである。

E P • U S P A T E N T A C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 PH-976-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/02916	国際出願日 (日.月.年) 02.05.00	優先日 (日.月.年) 14.07.99
出願人(氏名又は名称) 株式会社トランスジェニック		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N 15/85, A01K 67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N 15/85, A01K 67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneSeq/DBJ/GenBank/EMBL

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ARAKI K., et al. "Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells", Nucleic Acids Research (1997), Vol. 25, No. 4, p. 868-872	I-18
A	ARAKI K., et al. "Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters", Journal of Biochemistry (1997), Vol. 122, No. 5, p. 977-982	1-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.06.00

国際調査報告の発送日

04.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N 9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	IRMGARD S., et al. "Selective disruption of genes transiently induced in differentiating mouse embryonic stem cells by using gene trap mutagenesis and site-specific recombination", Molecular and Cellular Biology(1998), Vol. 18, No. 5, p. 3081-3088	1-18
A	LI Z., et al. "Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells", Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America(1996), Vol. 93, No. 12, p. 6158-6162	1-18

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing: 25 January 2001 (25.01.01)	
International application No.: PCT/JP00/02916	Applicant's or agent's file reference: PH-976-PCT
International filing date: 02 May 2000 (02.05.00)	Priority date: 14 July 1999 (14.07.99)
Applicant: YAMAMURA, Ken-ichi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
26 May 2000 (26.05.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HIRAKI, Yusuke
Toranomon No.5 Mori Building Third
Floor
17-1, Toranomon 1-chome
Minato-ku, Tokyo 105-0001
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 12 décembre 2001 (12.12.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PH-976-PCT	
International application No. PCT/JP00/02916	International filing date (day/month/year) 02 mai 2000 (02.05.00)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address TRANSGENIC INC. 1-18-7, Kuhonji Kumamoto-shi Kumamoto 862-0976 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address TRANSGENIC INC. Kumamoto SanNissei Building 4th Floor 2-11, Chuogai Kumamoto-shi Kumamoto 860-0802 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Susumu KUBO
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

